

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

***Stomoxys calcitrans*: Estabelecimento de colônia e  
efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios  
imatuross.**

**Ana Paula Rodrigues Moraes**

**2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

***Stomoxys calcitrans*: ESTABELECIMENTO DE COLÔNIA E EFEITO DE  
*Metarhizium anisopliae* SOBRE SEUS ESTÁGIOS IMATUROS.**

**ANA PAULA RODRIGUES MORAES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Avelino José Bittencourt**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2007

595.774

M828s

Moraes, Ana Paula Rodrigues, 1976 -

*Stomoxys calcitrans*: estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos / Ana Paula Rodrigues Moraes - 2007.

65f. : il.

Orientador: Avelino José Bittencourt.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 45-52.

1. Mosca dos estábulos - Teses. 2. Mosca dos estábulos - Controle - Teses. 3. *Metarhizium anisopliae* - Patogênese - Teses. I. Bittencourt, Avelino José, 1961 - II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

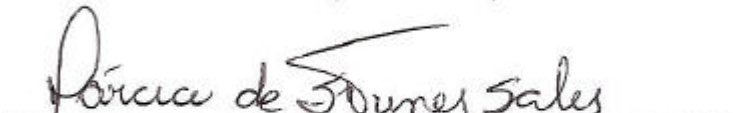
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**


**ANA PAULA RODRIGUES MORAES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2007.

  
Avelino José Bittencourt (Ph.D.) UFRRJ  
(Orientador)

  
Márcia Senna-Nunes Sales (Ph.D.) UNIG

  
Gonzalo Efrain Moya Borja (Ph.D.) UFRRJ

*“... Mas é preciso ter força, é preciso ter raça,  
é preciso ter gana sempre...”*

*Milton Nascimento e Fernando Brant*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos mais difíceis e por sempre me dar força para continuar.

Ao professor AVELINO JOSÉ BITTENCOURT e VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT pela orientação e amizade oferecida, o que resultou em meu crescimento como pessoa e como profissional.

A professora VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT por disponibilizar seu laboratório para realização do projeto.

Ao professor GONZALO EFRAIN MOYA BORJA e a sua orientada AMANDA CHAABAN pelas sugestões fornecidas para criação de moscas em laboratório.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pelo apoio fornecido para a realização do projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A RENATA BUARQUE FERNANDES (Departamento de Micologia – FIOCRUZ) pela identificação dos fungos contaminantes.

Aos funcionários IVAN SERAFIN DA SILVA e JOSÉ MAURÍCIO MATOS DE SOUZA pelo auxílio durante a realização do projeto.

Ao amigo BRUNO GOMES DE CASTRO por toda ajuda prestada para realização das fotos e para realização do projeto.

Aos amigos ISABELE DA COSTA ÂNGELO e ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES por todo apoio dado nos momentos mais difíceis para realização do projeto.

A amiga PAULA SANT'ANNA ALVES por toda ajuda na manutenção da colônia em laboratório.

A amiga ARISA MANDARINO PEREIRA por ter ajudado na confecção das gaiolas, idas e vindas ao laboratório e ao apoio dado nos momentos mais críticos, seja no desenvolvimento do projeto ou na vida pessoal.

A amiga THAÍS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO pelas sugestões dadas com relação à criação de moscas.

A TODOS meus amigos pela amizade, consideração e apoio dado, em todos os sentidos, para a realização do projeto.

Aos COLEGAS do curso de Pós-graduação pelo companheirismo durante a realização do curso.

Ao amigo, colega e esposo PABLO VIEIRA BADINI pelo amor, incentivo, apoio e compreensão.

As minhas irmãs FABIANA RODRIGUES MORAES e JULIANA RODRIGUES MORAES pelo amor, amizade, incentivo, apoio em todos os sentidos e compreensão.

Ao meu pai CELSO FERNANDO MORAES pelo apoio e compreensão pelos momentos ausentes para a realização deste trabalho. E para minha mãe ELINE RODRIGUES MORAES (*in memoriam*) por ter me ensinado a nunca desistir e por ter me mostrado o caminho para a aprendizagem.

Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Ana Paula Rodrigues Moraes, filha de Celso Fernando Moraes e Eline Rodrigues Moraes, nascida em 06 de outubro de 1976, no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Realizou o C.A. e quarta série do ensino fundamental no Colégio Externato Angelorum e o restante do curso no Colégio Municipal Deodoro. Coursou o ensino médio no Colégio Estadual Souza Aguiar, concluindo o terceiro ano no Centro de Estudos Supletivos Othon Barroso de Carvalho.

No ano de 1999 ingressou no Curso de Medicina Veterinária desta Instituição, diplomando-se em 29 de setembro de 2004.

Durante a graduação foi estagiária remunerada no Curral de Apreensão (convênio UFRRJ/Polícia Rodoviária Federal) entre os anos de 2000 a 2001. No ano de 2002, foi estagiária na área de Bacteriologia desta Instituição e no Hospital Veterinário de Macaé.

Em 2003, foi estagiária no Hospital Veterinário de Macaé, no Centro de Hemodiálise e Diagnóstico - Renal Vet (setor de Radiologia) e no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da instituição. Ainda neste mesmo ano, foi selecionada nos dois processos seletivos para monitoria nas disciplinas de Radiologia Médica e na disciplina de Anestesiologia e Técnicas Cirúrgicas II, não as assumindo por ter sido bolsista de Iniciação Científica do CNPq/PIBIC durante os anos de 2001 a 2004, sob orientação do professor Avelino José Bittencourt. E ainda, durante o ano de 2004, foi estagiária na área de Medicina e Cirurgia Veterinária no Instituto de Veterinária desta Instituição.

Em 2005, foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal, do Instituto de Veterinária desta Instituição, sob orientação do Professor Dr. Avelino José Bittencourt. Foi bolsista de Pós-graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2005 a março de 2007.

## RESUMO

MORAES, Ana Paula Rodrigues. *Stomoxys calcitrans*: Estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos. 2007. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

*Stomoxys calcitrans* é uma mosca hematófaga associada à redução da produtividade, devido ao estresse causado aos animais e a disseminação de patógenos. O conhecimento do controle de pragas, utilizando fungos entomopatogênicos, vem crescendo no decorrer dos anos, porém poucos trabalhos têm sido realizados visando o controle de *S. calcitrans*. O objetivo deste estudo foi estabelecer uma colônia de *S. calcitrans* direcionada ao bioensaio de controle microbiano, verificar o potencial patogênico de *Metarhizium anisopliae* sobre ovos, larvas e pupas, e ainda, avaliar três métodos de exposição dos ovos ao fungo estudado. Após adaptação das metodologias de criação de *S. calcitrans* descritas na literatura, a colônia foi mantida no Laboratório de Dípteros Hematófagos – UFRRJ. Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária – UFRRJ, onde foi utilizada a cepa 959 de *M. anisopliae* para elaboração das suspensões aquosas. No primeiro método, os ovos foram imersos na suspensão ( $2,2 \times 10^8$  conídios/ml e diluições) e transferidos para placa de Petri contendo algodão hidrófilo. No segundo método ( $2,3 \times 10^8$  conídios/ml e diluições) os ovos foram imersos e transferidos para o meio de desenvolvimento larval. No terceiro método ( $2,1 \times 10^8$  conídios/ml e diluições), os ovos foram depositados sobre a superfície do meio de desenvolvimento larval e uma alíquota da suspensão fúngica foi adicionada. As larvas com nove dias de desenvolvimento foram imersas na suspensão ( $2,1 \times 10^8$  conídios/ml e diluições) e transferidas para o meio de desenvolvimento larval, enquanto que as pupas de 16 dias de desenvolvimento foram imersas na suspensão ( $2,3 \times 10^8$  conídios/ml e diluições) e depositadas em placas de Petri. Foram utilizadas diluições na concentração de  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios/ml e controle positivo e negativo. A mortalidade foi avaliada no décimo dia após exposição, onde foi observado se ocorria mudança de estágio. Foi verificada alta mortalidade em todos os grupos (tratados e controles) no primeiro método de exposição de ovos. Nos outros dois métodos, foram obtidos 100% de inviabilidade dos ovos expostos à concentração de  $10^8$  conídios/ml. No segundo método, houve 92,5% de inviabilidade dos ovos, enquanto que no terceiro método, a inviabilidade foi de 53,33%, ambos na concentração de  $10^7$  conídios/ml. As concentrações subsequentes não apresentaram diferença significativa frente aos controles e nem entre os dois métodos de exposição fúngica. Nas exposições de larvas e pupas não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos e os controles. Suspensões de *M. anisopliae* em altas concentrações são capazes de inviabilizar ovos de *S. calcitrans*, entretanto, isto não ocorreu em larvas e pupas, pois o fungo não impediu o desenvolvimento destes. O método mais efetivo para o controle das formas imaturas de *S. calcitrans* foi o segundo método, entretanto, o que mais se assemelha às condições naturais seria o terceiro, onde foi obtido resultado significativo apenas na maior concentração fúngica. A adoção de metodologias experimentais que simulem condições naturais pode otimizar a utilização de fungos no controle de artrópodes, de forma que sua ação não seja comprometida, quando aplicados no campo.

**Palavras chave:** *Stomoxys calcitrans*, *Metarhizium anisopliae*, controle biológico



## ABSTRACT

MORAES, Ana Paula Rodrigues. *Stomoxys calcitrans*: colony establishment and effect of *Metarhizium anisopliae* in their immatures stages. 2007. 52p. Dissertation (Master in Veterinary Science) Veterinary Institute, Department of Veterinary Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

*Stomoxys calcitrans* is a hematophagous fly that is related to reduction in animal production due to the stress and dissemination of pathogens. The knowledge in plague control, using entomopathogenic fungi, has been growing year by year, but few works have been done to control *S. calcitrans*. The aims of this study were rearing a colony of *S. calcitrans* to make a bioassay of microbial control, verify the pathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* in eggs, larvae and pupae and access three methods of egg's exposition to the studied fungi. After methodologies adaptation of rearing *S. calcitrans* that are described in literature, the colony was maintained in the Laboratório de Dípteros Hematófagos - UFRRJ. The bioassays were done in the Laboratório de Controle Microbiano de Atrópodes de Importância Veterinária - UFRRJ, using the strain 959 of *M. anisopliae* in a water suspension. In the first method, eggs were immersed in the suspension ( $2.2 \times 10^8$  conidia /ml and dilutions) and transferred to Petri plates with hydrophilic cotton. In the second methods ( $2.3 \times 10^8$  conidia/ml and dilutions), eggs were immersed and transferred to the larval rearing medium. In the third method ( $2.1 \times 10^8$  conidia/ml and dilutions), eggs were put in the larval rearing medium surface and one aliquot of fungus suspension were added. Larvae with nine days of development were immersed in suspension ( $2.1 \times 10^8$  conidia/ml and dilutions) and after that were transferred to the larval rearing medium while pupae with 16 days of development were immersed in suspension ( $2.3 \times 10^8$  conidia/ml and dilutions) and were held in Petri plates. Experiments were carried out with  $10^7$ ,  $10^6$  and  $10^5$  concentrations of conidia/ml and positive and negative controls. The mortality was assessed on the 10<sup>th</sup> day after fungus exposure. It was verified high mortality in all treated and control groups in the first method of eggs' exposure. In the other two methods the eggs exposed to  $10^8$  conidia/ml concentration were 100% unviable. In the second method the eggs was 92.5% unviable and the third method was 53.33% both in  $10^7$  conidia/ml concentration. The subsequent concentrations did not show significant difference when compared to controls, neither between two methods of fungi exposure. Larvae and pupae exposure did not show statistic difference between treated and controls groups. *Metarhizium anisopliae* suspensions in high concentrations were capable to make unfeasible eggs of *S. calcitrans*; however, it did not happen in larvae and pupae experiments, in which fungi did not prevent their development. The second method was the best one to control immature forms of *S. calcitrans* but the third one resembles the nature conditions, in which has significant result only in the highest fungi concentration. Experimental methodologies that simulate nature conditions may optimize the utilization of fungi in arthropods' control, in a way that it does not modify its action when applied in the field.

**Key words:** *Stomoxys calcitrans*, *Metarhizium anisopliae*, biologic control

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Eclosão de ovos de <i>S. calcitrans</i> , expostos a diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>M. anisopliae</i> , pelo método de imersão e transferência para algodão em placa de Petri.....	30
<b>Tabela 2.</b> Eclosão de ovos de <i>S. calcitrans</i> , expostos a diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>M. anisopliae</i> , pelo método de imersão e transferência para o meio de desenvolvimento larval.....	30
<b>Tabela 3.</b> Eclosão de ovos de <i>S. calcitrans</i> , expostos a diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>M. anisopliae</i> , pelo método de gotejamento da suspensão sobre os ovos em meio de desenvolvimento larval.....	31
<b>Tabela 4.</b> Comparação entre a eclosão de ovos, expostos às altas concentrações das suspensões aquosas de <i>M. anisopliae</i> , pelos segundo e terceiro métodos.....	31
<b>Tabela 5.</b> Mortalidade de larvas de <i>S. calcitrans</i> , expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>M. anisopliae</i> , pelo método de imersão e transferência ao meio de desenvolvimento larval.....	33
<b>Tabela 6.</b> Mortalidade de moscas de <i>S. calcitrans</i> , provenientes de larvas expostas a diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>M. anisopliae</i> .....	33
<b>Tabela 7.</b> Inviabilidade de pupas provenientes de larvas de <i>S. calcitrans</i> imersas em diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>M. anisopliae</i> .....	35
<b>Tabela 8.</b> Comparação entre a inviabilidade de ovos e larvas de <i>S. calcitrans</i> , expostos às elevadas concentrações das suspensões fúngicas de <i>M. anisopliae</i> , pelo método de imersão e transferência ao meio de desenvolvimento larval.....	35
<b>Tabela 9.</b> Inviabilidade de pupas de <i>S. calcitrans</i> , expostas as diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>M. anisopliae</i> , pelo método de imersão e transferência para placa de Petri.....	37
<b>Tabela 10.</b> Comparação entre a inviabilidade de pupas, provenientes de larvas imersas em diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>M. anisopliae</i> e de pupas expostas ao mesmo método.....	37
<b>Tabela 11.</b> Comparação entre a mortalidade dos estágios imaturos de <i>S. calcitrans</i> , expostos às suspensões aquosas de <i>M. anisopliae</i> na concentração de $10^8$ conídios/ml.....	38
<b>Tabela 12.</b> Comparação entre a mortalidade dos estágios imaturos de <i>S. calcitrans</i> , expostos às suspensões aquosas de <i>M. anisopliae</i> , na concentração de $10^7$ conídios/ml.....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gaiola plástica destinada à criação de adultos e obtenção de ovos de <i>S. calcitrans</i> em condições laboratoriais.....	23
<b>Figura 2.</b> Gaiola plástica destinada ao transporte de adultos de <i>S. calcitrans</i> capturados ou para acondicionamento de pupas em câmara climatizada.....	23
<b>Figura 3.</b> Placa de Petri contendo almofada de gaze para o fornecimento de sangue bovino citratado aos adultos de <i>S. calcitrans</i> , como fonte de alimento e local pra oviposição.....	25
<b>Figura 4.</b> Água filtrada fornecida em Becker de vidro e gaze para adultos de <i>S. calcitrans</i> criadas em condições laboratoriais.....	25
<b>Figura 5.</b> Crescimento de hifas de <i>M. anisopliae</i> e presença de conídios sobre ovo de <i>S. calcitrans</i> exposto a suspensão fúngica na concentração de $2,3 \times 10^8$ conídio/ml pelo método de imersão e transferência ao meio de desenvolvimento larval.....	40
<b>Figura 6.</b> Larva de <i>S. calcitrans</i> com aspecto liquefeito e presença de hifas de <i>M. anisopliae</i> , proveniente da exposição de ovos a suspensão fúngica na concentração de $2,1 \times 10^8$ conídios/ml pelo método de gotejamento.....	40
<b>Figura 7.</b> Larva de <i>S. calcitrans</i> , apresentando coloração creme, aspecto enrijecido e com presença de hifas de <i>M. anisopliae</i> , resultante da imersão em suspensão fúngica na concentração de $2,1 \times 10^8$ conídios/ml.....	43
<b>Figura 8.</b> Larva de <i>S. calcitrans</i> , apresentando coloração creme, aspecto enrijecido e com presença de hifas e conídios de <i>M. anisopliae</i> , expostapor imersão em suspensão fúngica na concentração de $2,1 \times 10^8$ conídios/ml.....	43
<b>Figura 9.</b> Pupa de <i>S. calcitrans</i> apresentando má formação, proveniente da exposição de larvas por imersão na concentração de $2,1 \times 10^8$ conídios/ml.....	43

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Caracterização Morfológica de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	2
2.2 Ciclo Biológico de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	2
2.3 Comportamento de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	4
2.4 Perdas Econômicas Causadas por <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	4
2.4.1 Lesões.....	5
2.4.2 Ataque de <i>Stomoxys calcitrans</i> a humanos.....	5
2.4.3 Transmissão de agentes patogênicos por <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	6
2.5 Criação de <i>Stomoxys calcitrans</i> em Condições Laboratoriais.....	6
2.6 Controle Populacional de Moscas.....	7
2.6.1 Fungos entomopatogênicos no controle de moscas.....	8
2.6.2 Biologia e ação de fungos entomopatogênicos em insetos.....	11
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1 Localização do Experimento.....	13
3.2 Criação de <i>Stomoxys calcitrans</i> em Condições Laboratoriais.....	13
3.2.1 Obtenção de exemplares de moscas adultas.....	13
3.2.2 Gaiolas entomológicas.....	13
3.2.3 Temperatura e umidade.....	14
3.2.4 Limpeza das gaiolas.....	14
3.2.5 Obtenção e fornecimento de sangue.....	14
3.2.6 Fornecimento de água.....	14
3.2.7 Dieta para desenvolvimento larval e pupal.....	15
3.2.8 Contaminação fúngica.....	15
3.2.9 Obtenção de ovos.....	15
3.2.10 Obtenção das larvas.....	15
3.2.11 Obtenção das pupas.....	16
3.2.12 Obtenção dos adultos.....	16
3.3 Fungo Entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	16
3.3.1 Obtenção da amostra fúngica.....	16
3.3.2 Elaboração das suspensões fúngicas.....	16
3.4 Bioensaios.....	17
3.4.1 Utilização de grupos controle.....	17
3.4.2 Exposição <i>in vitro</i> dos estágios imaturos de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	18
3.4.2.1 Métodos de exposição dos ovos as suspensões fúngicas.....	18
3.4.2.2 Exposição de larvas as suspensões fúngicas.....	18
3.4.2.3 Exposição de pupas as suspensões fúngicas.....	19
3.5 Viabilidade Conidial das Suspensões Fúngicas.....	19
3.6 Contagem de Indivíduos Expostos as Suspensões Fúngicas.....	19
3.7 Confirmação da Ação Fúngica sobre os Indivíduos Expostos.....	19
3.8 Análise Estatística.....	20
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
4.1 Formação de Colônia de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	22
4.1.1 Gaiolas entomológicas.....	22
4.1.2 Temperatura e umidade.....	24

4.1.3 Fornecimento de sangue.....	24
4.1.4 Fornecimento de água.....	24
4.1.5 Dieta para desenvolvimento larval.....	26
4.1.6 Contaminação fúngica.....	26
4.1.7 Comportamento de <i>Stomoxys calcitrans</i> em laboratório.....	27
4.2 Bioensaios.....	27
4.2.1 Mortalidade dos controles.....	28
4.2.2 Infecção <i>in vitro</i> de ovos.....	28
4.2.3 Comparação entre metodologias de infecção <i>in vitro</i> de ovos.....	29
4.2.4 Infecção <i>in vitro</i> de larvas.....	32
4.2.5 Comparação do efeito da exposição <i>in vitro</i> de ovos e larvas.....	34
4.2.6 Infecção <i>in vitro</i> de pupas.....	34
4.2.7 Comparação da mortalidade de ovos, larvas e pupas.....	36
4.3 Comportamento Fúngico sobre os Estágios Imaturos de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	39
4.3.1 Infecção <i>in vitro</i> de ovos.....	39
4.3.2 Infecção <i>in vitro</i> de larvas e pupas.....	41
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) é um díptero hematófago conhecido como “mosca dos estábulos”. Possuidora de picada dolorosa, esta mosca ocasiona grande desconforto aos animais parasitados (MIHOK; CLAUSEN, 1996; BITTENCOURT, 1998). Ela também está associada à disseminação e transmissão de diferentes agentes patogênicos (TARRY; CARROLL, 1988), inclusive alguns responsáveis por infecções septicêmicas (SOULSBY, 1987).

A mosca dos estábulos está presente em várias regiões do globo terrestre. Seus estudos têm se difundido no decorrer dos anos, porém a nível nacional, os diferentes aspectos que a envolvem, como os prejuízos causados, ainda são escassos (BITTENCOURT, 1998). Moraes (1990) destaca que a localização do Brasil entre o Trópico de Capricórnio e a linha do Equador, resulta em clima tropical com regiões de clima subtropical e temperado, o que favorece a permanência da mosca em diferentes regiões do país.

Associado ao aumento da resistência aos produtos químicos, diferentes microorganismos têm sido pesquisados no decorrer dos anos, com intuito de verificar seu potencial patogênico sobre os diferentes parasitos de importância econômica (DAVIDSON; SWEENEY, 1983). Outro fator importante é a crescente conscientização sobre a preservação do meio ambiente e os efeitos negativos resultantes da utilização desregulada destes produtos, pois estes resíduos químicos têm sido verificados nos produtos derivados de animais de produção e no próprio ambiente. (ALVES, 1998).

No Brasil, os estudos sobre a patologia dos insetos iniciaram-se há pouco mais de 70 anos, onde os trabalhos concentraram-se principalmente nos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (ALVES, 1998). A produção comercial de algumas espécies fúngicas, incluindo *M. anisopliae*, tem sido realizada por agências privadas ou governamentais. Sua utilização como controlador biológico e a aplicação no controle de artrópodes pragas, tem crescido em todo o mundo (MCCOY; TIGANO-MILANI, 1992).

Poucos trabalhos científicos, envolvendo o controle microbiano de *S. calcitrans*, encontram-se disponíveis, dentre eles destaca-se o trabalho de Skovgard e Steenberg (2002), os quais verificaram a prevalência de fungos entomopatogênicos na mosca dos estábulos e a atividade de parasitóides sobre suas pupas. Outros dois trabalhos avaliam experimentalmente a ação entomopatogênica de *M. anisopliae* e de *B. bassiana*, sendo o primeiro realizado por Bernal et al. (2003) e o segundo por Watson et al. (1995).

O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma colônia de *S. calcitrans* direcionada a utilização em bioensaios de controle microbiano, verificar o potencial patogênico do fungo *M. anisopliae* sobre ovos, larvas e pupas, e ainda, avaliar três métodos de exposição dos ovos ao fungo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Caracterização Morfológica de *Stomoxys calcitrans*

A mosca dos estábulos possui tamanho similar ao da mosca doméstica. Medindo em torno de seis milímetros, apresenta coloração acinzentada, quatro listras escuras longitudinais, sendo as laterais mais curtas, não chegando até o final do escudo do tórax. Seu abdome é mais curto e possui três manchas escuras arredondadas no segundo e terceiro segmentos abdominais. Possui aparelho bucal do tipo picador, proeminente e projetado cranialmente, localizado entre os curtos palpos. Este é provido de pequenas labelas que apresentam estruturas similares a pequenos dentes. A veia  $M_{1+2}$  de sua asa se curva suavemente e a célula  $R_5$  apresenta-se aberta, terminando no ápice ou por detrás da mesma (SOULSBY, 1987).

Os adultos são sexados pelo formato e disposição dos olhos facetados, ou seja, machos possuem olhos holópticos e fêmeas olhos dicópticos, e ainda, são distinguidos pelas diferenças morfológicas da genitália (FURMAN; CATTS, 1982).

Os ovos apresentam um sulco longitudinal em um dos lados, medem aproximadamente um milímetro de comprimento e podem apresentar coloração variando de branca à amarela (SOULSBY, 1987) ou pérola (MELLO, 1989). Medindo até dez milímetros de comprimento, as larvas da mosca dos estábulos são similares às larvas da mosca doméstica, excetuando-se suas placas estigmáticas que são mais separadas e os espiráculos se apresentam em forma de 'S' (SOULSBY, 1987). As pupas são menores que as de *Musca domestica* e apresentam uma das extremidades mais delgada (NEVES; FARIA, 1988). Newstead (1906) apud Macedo (2001) relata que as pupas inicialmente apresentam uma coloração branca, mas esta torna-se castanha em torno de duas horas.

### 2.2 Ciclo Biológico de *Stomoxys calcitrans*

Como a mosca dos estábulos utiliza matéria orgânica para realizar sua postura, autores como Guimarães (1984) e Cook et al. (1999) destacam o desenvolvimento das fases imaturas de *S. calcitrans* em fezes de cavalos, bovinos, ovinos e principalmente de aves (GUIMARÃES, 1984; BITTENCOURT, 1998). Bruno et al. (1993) mencionam que as fezes acumuladas de aves confinadas constituem excelente substrato para o desenvolvimento de dípteros e relatam que estes são capazes de voar até 10 km de distância da área onde foi realizada a postura, o que estaria relacionado a elevados prejuízos à pecuária. Dos 16 municípios do estado de São Paulo visitados neste estudo, em 31,25% foi confirmada a presença da mosca dos estábulos. Entretanto, Bayley et al. (1973) constataram que estas moscas podem alcançar distâncias ainda maiores, ou seja, machos podem chegar a 29,91 quilômetros de distância, enquanto que as fêmeas alcançam 29,11 quilômetros em 24 horas.

Guimarães (1983) relata que a alfafa, grãos ou farinhas umedecidas encontradas embaixo dos coxos nos currais, pilhas de grama cortada em jardins, fezes de aves ou restilo de usinas de açúcar constituem ambiente favorável para procriação da mosca dos estábulos, principalmente quando este se apresenta amolecido e fermentado. Em trabalho realizado por Badini et al. (2003), em propriedades leiteiras no município de Resende – RJ, constataram que o acúmulo de esterco bovino junto aos currais, restos alimentares ao redor dos cochos de alimentação, resíduos de cervejaria (cevada) e de bebidas destiladas (caldo de arroz) nas instalações estariam relacionados ao desenvolvimento desta mosca.

O ciclo de vida da mosca dos estábulos varia de 12 a 60 dias, estando diretamente relacionado às características climáticas da região. Guimarães (1983) relata que uma fêmea adulta pode produzir até 632 ovos, fazendo mais de 20 posturas em toda sua vida.

Mello e Garcia (1988) observaram que o período de postura foi variável, entre três e 17 dias, com média de 10,2 dias. Também foi observado um ritmo irregular de postura, onde os intervalos entre as mesmas foram de um a sete dias. O número de ovos por postura oscilou de três a 151 ( $X = 63,58$  ovos/postura). Com estes dados, os autores destacam não haver relação entre o número de posturas e o número de ovos totais depositados. Foi verificada uma periodicidade na deposição de ovos sem, entretanto, ser uma característica harmoniosa ou homogênea. Os ovos eclodem de um a quatro dias, entretanto, este período pode se prolongar em ambientes de baixa temperatura (URQUHART et al., 1996) ou ser reduzido em locais de temperaturas mais altas (GUIMARÃES, 1983).

Após a eclosão, as larvas se alimentam de material orgânico vegetal, e amadurecem num intervalo de seis a 30 dias (URQUHART et al., 1996). Guimarães (1983) relata que o período deste estágio varia de 14 a 26 dias ( $\approx 12$  dias) à temperatura de 21 a 26 °C, e que as larvas recém-eclodidas se aprofundam na matéria orgânica a procura de abrigo da luz, bem como para evitar seu ressecamento. Os resultados obtidos por Mello (1989) revelam que o período larval dura em média 15,9 dias à temperatura de 18°C e 70-80% de umidade relativa (U.R.). A variação entre o período de desenvolvimento larval encontrada nos dois estudos está relacionada diretamente às condições térmicas as quais as larvas foram expostas, pois maior atividade metabólica é constatada nas larvas expostas a temperaturas mais altas.

Através de cortes longitudinais Neves e Faria (1988) realizaram a coleta de pupas em esterco bovino, verificando a espécie, profundidade e a frequência em que foram encontradas durante o ano. A pupação de *S. calcitrans* pode ocorrer, segundo estes autores, em profundidades maiores de dez centímetros, mas a emergência da mosca adulta torna-se mais difícil. O maior número de pupas encontradas neste estudo estava em torno dos cinco centímetros de profundidade.

A pupação pode durar de seis a dez dias, estando diretamente relacionada à temperatura e umidade as quais as pupas foram expostas (SOULSBY, 1987). Isto foi verificado em trabalho realizado por Guimarães (1984), no qual o período pupal variou de seis a 26 dias em temperaturas de 21 °C a 26 °C, enquanto que Mello (1989) obteve média de desenvolvimento pupal de 35,3 dias a temperatura de 18°C e 70 – 80% U.R.

Mello (1989), relata que à temperatura de 27°C e 70-80% U.R. o desenvolvimento embrionário, período larval e pupal foi de 1,72, 10,4 e 3,08 dias, respectivamente. A eclodibilidade alcançada foi de 79,61 %. Das larvas obtidas, apenas 51,59% se tornaram pupas, e destas, 89,16% se transformaram em adultos. Segundo o mesmo autor, o período larval é considerado a fase crítica do desenvolvimento do inseto, onde as perdas são consideráveis, enquanto que o período pupal oferece maior segurança no desenvolvimento do inseto, pois a larva, antes de iniciar a pupação, procura locais para se proteger contra o excesso de umidade ou ressecamento no substrato, inimigos naturais e predadores.

Nos locais de temperaturas mais elevadas a mosca dos estábulos desenvolve-se continuamente, não havendo interrupção do ciclo de vida ao longo do ano (GUIMARÃES, 1983). O esterco de aves poedeiras, que apresenta teor de umidade entre 45 – 55% favorece o desenvolvimento das larvas de *S. calcitrans* (BRUNO et al., 1993).

Em geral, os adultos de *S. calcitrans* vivem por até um mês. Ocorrida a emergência, a fêmea inicia a oviposição após nove dias, aproximadamente (SOULSBY, 1987). Killough e McKinstry (1965) também destacam que a fêmea não realiza postura antes do oitavo dia de emergência. Guimarães (1984) menciona um período maior de 18 dias, quando a temperatura varia de 21 a 26 °C. Segundo Mello (1989), é necessário que as fêmeas realizem a ingestão de sangue antes de iniciar a atividade reprodutiva para que ocorra o amadurecimento de seus ovários. A alimentação leva aproximadamente três minutos, mas é constantemente interrompida em consequência da dor ocasionada por sua picada nos animais parasitados (CARRERA, 1991; URQUHART et al., 1996). Parr (1962) determinou que a mosca pode



ingerir um volume de sangue equivalente a três vezes a sua massa corporal em cada repasto sangüíneo, ou seja, 8,6 mg em média.

### **2.3 Comportamento de *Stomoxys calcitrans***

Machos e fêmeas são hematófagos e podem ser observados alimentando-se em diversas espécies, como bovinos, eqüinos, cães, homem (GUIMARÃES, 1983; BITTENCOURT, 1998), aves e até répteis (SOULSBY, 1987).

Lara et al. (1975) verificaram que em local onde há intensa incidência solar, as moscas preferem as cores branca e amarela, mas à sombra preferem a cor azul. CILEK (2003) também observou maior preferência da mosca pela cor azul, quando comparada às cores laranja e branca, porém não houve diferença significativa entre a cor azul e vermelha. Parr (1962) observou que as vacas de pelagem preta foram as mais atacadas. Destaca ainda, que tanto a cor como o odor seriam importantes quando as moscas se encontram próximas aos animais a serem parasitados.

Diferentes resultados foram obtidos por Bittencourt (1998), onde foi observado maior número de moscas em bovinos de pelagem vermelha e branca, seguida pela pelagem castanha, preta e branca e amarela. Badini et al. (2003) constataram a preferência das moscas por vacas de pelagem de coloração preta e branca, seguida pela preta, moura, baia e castanha. Porém, em outro estudo constatou-se que os animais mais parasitados possuíam pelagem castanha (ALMEIDA et al., 2001).

Bittencourt e Moya Borja (2000) relatam a preferência da mosca dos estábulos em se alimentar nos membros torácicos, pela observação das lesões ocasionadas por suas picadas, principalmente nas extremidades dos membros. Isto estaria relacionado à disponibilidade de vasos sangüíneos superficiais existentes nesta região, que favoreceria a sua alimentação. Em estudo feito pelos mesmos autores em 2002, foi demonstrado que o parasitismo desta mosca é realizado onde há pouco ou ineficiente movimento cutâneo, ou seja, na região abaixo do joelho, espádua, costado, braço e codilho (BITTENCOURT; MOYA BORJA, 2002). Badini et al. (2003) constataram a mesma preferência pelos membros torácicos, principalmente na região do braço, seguido pelo tórax, abdômen, membros pélvicos, pescoço, cabeça e úbere.

Urquhart et al. (1996) destacam que a mosca adulta prefere a luz solar forte e se alimentar ao ar livre, mas pode parasitar os animais mesmo em recinto fechado. Além disso, ela é mais abundante no verão e no outono, vivendo em torno de um mês em condições naturais (SOULSBY, 1987), ou seja, nas épocas quentes do ano (GUIMARÃES, 1983). Neves e Faria (1988) relatam que nos meses quentes e chuvosos (outubro a março) é de se esperar maior número de moscas adultas e pupas.

Carrera (1991) relata que o maior número de moscas são encontradas pousadas em moirões de cerca, muros ou paredes que não estejam distantes dos animais a serem parasitados. Estes são atacados preferencialmente antes das dez horas da manhã e ao entardecer, ou seja, as moscas evitam atacar nas horas mais quentes do dia. Após a alimentação estas preferem repousar em locais frescos e sombreados. Em estudo realizado na Costa Rica por Herrero et al. (1989) constataram que os maiores níveis de infestação de *S. calcitrans*, ao longo do dia, são observados às dez e 16 horas.

### **2.4 Perdas Econômicas Causadas por *Stomoxys calcitrans***

Os danos causados pela mosca dos estábulos são difíceis de serem estimados, visto que eles podem estar relacionados aos diferentes efeitos do seu parasitismo. Rasmussen e Campbell (1979) destacam que as perdas anuais nos Estados Unidos foram estimadas em 142 milhões de dólares. Grisi et al. (2002) estimaram que no Brasil as perdas podem atingir mais de 100 milhões de dólares/ano.

Bruce e Decker (1958) mencionam que as perdas na produtividade animal podem alcançar até 20%. Em um período de 100 dias, quando comparado o ganho de peso e a média de infestação da mosca dos estábulos em bovinos, foi verificado que os animais livres das moscas apresentavam ganho/dia de 90g e 200g a mais que os parasitados por 50 e 100 moscas, respectivamente (CAMPBELL et al., 1977). Campbell et al. (1987) mencionam que a presença de 35 moscas parasitando o membro de um bovino são suficientes para ocasionar perdas de 12% na conversão alimentar e 20% em queda de peso. Outros autores (DOUGHERTY et al., 1993) observaram redução no ganho de peso de bovinos na ordem de 28,65%, devido ao efeito direto das picadas.

Em seu estudo sobre o comportamento dos animais expostos ao parasitismo da mosca dos estábulos, Bittencourt (1998) verificou que estes exibiam respostas às picadas, dentre elas podem ser destacados o balançar de cabeça, orelhas e movimentação cutânea, com o objetivo de espantar as moscas e na ocorrência de parasitismo intenso, os bovinos se aglomeravam. Com isso, além de aumentar o consumo de energia, o pastejo é afetado, havendo deste modo, influência negativa no ganho de peso. Inquérito epidemiológico também foi realizado pelo mesmo autor, no qual foi constatado que a mosca dos estábulos pode gerar alterações comportamentais nos bovinos. De acordo com os entrevistados, 98% relataram que os animais ficavam aglomerados, 100% responderam que os animais apresentavam-se inquietos quando picados pela mosca e 80% disseram que os animais procuravam a água para se proteger. Dentro deste mesmo contexto, 36,5% dos entrevistados responderam que a mosca incomodava e não deixava os animais pastarem e 13,5% relataram que, além dos animais se apresentarem inquietos, estes diminuía a produção de leite.

Campbell et al. (1987) observaram que os animais suportam o parasitismo de até duas moscas por membro torácico ou seis moscas em todo o corpo sem causar prejuízos econômicos, considerando-se o ganho de peso, conversão alimentar e custos com inseticidas.

#### **2.4.1 Lesões**

Outros prejuízos podem surgir pela ação parasitária da mosca dos estábulos, como lesões de pele em bovinos, principalmente os que se apresentam em condição de magreza, devido à menor camada de gordura subcutânea destes animais (PHILPOOT; EZEH, 1978).

White e Bourdeau (1995) verificaram que as lesões ocorridas nas bordas e dobradura das orelhas e extremidades do focinho de cães seriam ocasionadas pelas picadas de moscas, como a mosca dos estábulos, o que desencadearia uma reação de hipersensibilidade, com o desenvolvimento de dermatites, inclusive ulcerativas e furunculose eosinofílica.

Em inquérito epidemiológico realizado por Bittencourt (1998) foi constatado que 3,8% dos entrevistados responderam que a mosca causava lesões no pescoço e tórax, 59,6% relataram lesões nos membros torácicos, 17,3% nos membros pélvicos, 1,9% no úbere e mesmo percentual nos tetos dos bovinos.

#### **2.4.2 Ataque de *Stomoxys calcitrans* a humanos**

O parasitismo da mosca dos estábulos não está limitado aos animais, pois em locais onde há uma população elevada, é possível observar a mosca atacando as pessoas que os manejam. Também há relatos da mosca parasitando as pessoas em praias da Flórida, em decorrência ao acúmulo e fermentação de diferentes espécies de algas em áreas costeiras (KING; LENERT, 1936), e ainda, em parques que apresentem gramíneas cortadas e acumuladas (HANSEN, 1951), mostrando que é possível encontrar esta espécie em diferentes regiões, desde que seja fornecido um ambiente favorável para oviposição e desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca.

### 2.4.3 Transmissão de agentes patogênicos por *Stomoxys calcitrans*

Do ponto de vista sanitário, as moscas dos estábulos possuem grande importância, devido a sua condição hematófaga e capacidade de transmissão ou veiculação de agentes patogênicos (GUIMARÃES, 1983). Soulsby (1987) relata a capacidade de transmissão mecânica de microorganismos patogênicos durante a sua alimentação, como as diferentes espécies de *Trypanosoma* sp transmitidas aos eqüinos, bovinos, ovinos, caprinos, e até aos humanos na África.

Como a picada da mosca dos estábulos é dolorosa (MIHOK; CLAUSEN, 1996; BITTENCOURT, 1998), os animais reagem tentando espantar a mosca. Conseqüentemente, a disseminação e transmissão de agentes patogênicos, como protozoários, riquetsias, bactérias, fungos e vírus são favorecidas (PHILPOOT; EZEH, 1978; FOIL et al., 1983; TARRY; CARROLL, 1988), pois ao se alimentar em animais positivos, a mosca é capaz de se infectar e carrear diferentes microorganismos patogênicos aos animais saudáveis.

Soulsby (1987) menciona a mosca dos estábulos como hospedeiro intermediário de *Habronema majus* e como responsável pela transmissão mecânica de agentes que desenvolvem infecções septicêmicas. Moscas adultas foram observadas veiculando ovos de *Dermatobia hominis* tanto a campo como em condições laboratoriais (MOYA BORJA, 1982). Em estudo experimental realizado por Foil et al. (1983) foi verificada a capacidade de *S. calcitrans* em carrear o vírus da anemia infecciosa eqüina de pôneis infectados aos sadios.

Stork (1979) correlacionou o pico de aparecimento de moscas dos estábulos ao aumento de casos de mastite em rebanhos leiteiros, o qual foi substanciado pelo isolamento de *Corynebacterium pyogenes* nas moscas coletadas. Além disso, a adoção de medidas de controle de moscas resultou na diminuição de casos da doença nos rebanhos estudados. Em estudo realizado por Badini et al. (2004), foi avaliada a capacidade de *S. calcitrans* em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites. Neste estudo, foi constatada a espécie *Staphylococcus aureus aureus* em 41,65% das amostras de leite de vacas leiteiras positivas para mastite clínica ou subclínica e 50 % dos isolados encontrados nas moscas pertenciam a mesma espécie. A similaridade entre isolado bacteriano das amostras de leite e de moscas também ocorreu para *Klebsiella oxytoca*. Em outro estudo, espécies como *Escherichia coli* e *S. aureus* também foram isoladas de amostras de leite de vacas positivas para mastite e de macerado de moscas capturadas em mesma propriedade (MORAES, et al., 2004). Ambos os estudos foram realizados em municípios onde uma das atividades produtivas é baseada na produção de leite e horticultura. Esta associação resulta na concentração de animais, acúmulo de esterco bovino e utilização de cama de frango para a adubação de hortaliças, o que torna o ambiente favorável para o desenvolvimento e proliferação da mosca.

### 2.5 Criação de *Stomoxys calcitrans* em Condições Laboratoriais

Com relação à criação da mosca dos estábulos em condições laboratoriais, autores relatam que são obtidos diferentes resultados, e que há maior dificuldade em sua criação quando comparada à criação de moscas domésticas (JONES, 1966; WATSON et al., 1995; MACEDO, 2001; SKOVGARD; STEENBERG, 2002). O detalhamento com relação à comparação entre os métodos de criação da mosca ou modelos de gaiola, fornecimento de sangue, métodos para limpeza da gaiola, manipulação das larvas recém-eclodidas e metodologias para evitar a contaminação fúngica em gaiolas são pouco disponibilizados.

Avaliando-se o tipo de alimentação fornecida às moscas dos estábulos, foi verificado que com menos de duas a três horas de realizada a emergência, estas rejeitam a alimentação de sangue, solução açucarada ou água. Esse comportamento estaria relacionado ao não desenvolvimento completo dos receptores sensoriais existentes nas patas e peças bucais, já desenvolvidos em moscas mais velhas (LEE; DAVIES, 1979). Foil e Hogsett (1994) mencionam que os adultos dependem de sangue de vertebrados para sobreviver e se

reproduzir, mas necessitam de pouco tempo com o hospedeiro para se alimentar. Jones (1966) destaca que o fornecimento de sangue de bovinos, eqüinos, ou de suínos resulta em postura satisfatória, porém este resultado não é obtido quando são utilizados sangue de carneiro, cobaia ou de ratos. Sutherland (1978) constatou que moscas alimentadas com sangue de herbívoros produzem mais ovos do que as alimentadas com sangue de carnívoros e onívoros, mas a postura não é realizada quando as moscas são alimentadas com sangue de galinhas.

Em seu estudo, Parr (1962) alimenta suas moscas com sangue bovino citratado em almofada de algodão absorvente, o qual é oferecido duas vezes ao dia, em ambiente de 26,6°C e 60-70 % de umidade relativa. Verificou que uma fêmea chegou a ovipor 408 ovos distribuídos em 11 posturas, com 71% a 76% de eclodibilidade. Meola et al. (1977) constataram que a dieta de sangue fornecida às moscas ocasionou a secreção de ferormônio sexual, e o mesmo não foi observado nas moscas que ingeriram solução salina ou glicose. Mello e Garcia (1988) destacam que a alimentação realizada diretamente sobre o hospedeiro, ou seja, sangue “in natura”, fornece qualidade e temperatura do alimento para as moscas, influenciando favoravelmente na longevidade e na postura destas.

Com relação ao meio de desenvolvimento dos estágios imaturos de *S. calcitrans*, Putman (1983) relata que fezes frescas atraem diferentes dípteros e representa um meio de desenvolvimento, onde as larvas completam seu ciclo em menor tempo. Para criação de moscas Richardson (1932) e Doty (1937) utilizaram um produto comercial que possui grande concentração de açúcar, malte, farelo de trigo, farinha de alfafa e casca de aveia. Moraes (1990) obteve melhores resultados na criação de moscas dos estábulos quando usou dieta nutritiva composta por cana-de-açúcar, farelo de trigo, farinha de carne, bicarbonato de sódio associado ao vinhoto. Estes componentes são similares ao utilizado por Christmas (1970) e Macedo (2001). Ambos os pesquisadores não usaram vinhoto na composição da mistura de desenvolvimento larval e pupal. Christmas (1970) utilizava o farelo de peixe, enquanto Macedo (2001) manteve farelo de carne em sua mistura.

Macedo (2001) destaca que as larvas da mosca dos estábulos se desenvolvem em material orgânico variável, desde que este se apresente úmido, fermentado e friável. Além disso, a temperatura não deve exceder a 31,1°C, como observado por Hansens (1951), pois em seu experimento não foram encontradas larvas de *S. calcitrans*, quando esta temperatura ultrapassada.

## 2.6 Controle Populacional de Moscas

Por razões ecológicas, os produtos químicos iniciam seu declínio à medida que organizações particulares ou oficiais investem em programas que evitem a poluição do ambiente. Deste modo, novas pesquisas têm sido realizadas no aprimoramento do controle biológico ou no controle integrado (químico e biológico). Há atualmente a tendência mundial das indústrias pecuárias em desenvolver produtos orgânicos, permitindo ao consumidor obter alimentos livres de agrotóxicos, o que leva estas empresas a realizarem uma linha de produção ecológica de seus produtos (BERNAL et al., 2003). As pesquisas que avaliam fungos entomopatogênicos como agentes no controle biológico têm aumentado no decorrer dos anos em todo o mundo (MCCOY; TIGANO-MILANI, 1992).

As drásticas modificações ocorridas na fauna e na flora estão relacionadas à ação direta ou indireta do homem, seja pela transformação do ambiente natural em área urbana ou rural, o que leva a extinção da maioria das espécies nativas, ou ainda, a adaptação de algumas espécies às novas condições. Neste mesmo contexto, certos dípteros, como a mosca dos estábulos, apresentam alta capacidade de adaptação às condições ecológicas criadas pelo acúmulo de material orgânico (GUIMARÃES, 1983).

Soulsby (1987) menciona que os maiores problemas ocasionados pela mosca dos estábulos estão relacionados aos lugares onde podem ser encontradas condições adequadas ao

seu desenvolvimento. Com isso, as medidas de controle devem ser direcionadas a estes locais, ou seja, a umidade das camas ou feno associados às fezes, resíduos alimentícios ou dejetos vegetais acumulados em estábulos ou pátios devem ser eliminados. A remoção dos resíduos alimentares úmidos também é relatada por Guimarães (1983), o qual destaca a necessidade destes serem espalhados em uma área maior, com o objetivo de acelerar o processo de secagem. E ainda, o acúmulo de restos de culturas, plantas daninhas, cebolas, gramas devem ser evitados, pois sua fermentação constitui um importante local de criação desta espécie. Foil e Hogsette (1994) relatam que as larvas se desenvolvem em esterco, alimento derrubado pelos animais ou vegetação deteriorada e que o manejo adequado do habitat das larvas nas instalações pode ser considerado um dos pontos mais importantes no controle da mosca dos estábulos.

Com o objetivo de eliminar o substrato de desenvolvimento de *S. calcitrans* e *Haematobia irritans*, a remoção das fezes dos bovinos resulta em um gasto médio de 0,348 dólares, e quando são utilizadas inseticidas, são acrescentados 0,021 dólares por vaca/dia. Mesmo havendo um aumento do custo no manejo dos dejetos dos animais, a adoção deste procedimento é de grande importância para a redução da resistência aos inseticidas (LAZARUS et al., 1989) e da redução populacional dos estágios imaturos encontrados nestas fezes, o que resultaria em menor número de moscas adultas parasitando os animais.

O uso indiscriminado de inseticidas nas granjas não é recomendável, devido à rápida resistência adquirida pelas moscas aos produtos químicos e ao risco de destruição de outros artrópodes, incluindo os predadores de ovos e larvas de dípteros (LEGNER; OLTON, 1968). Herd et al. (1993) também destacam o impacto da utilização de endoparasiticidas sobre a população de artrópodes nas fezes e o efeito potencial sobre a degradação e reciclagem de nutrientes.

Outro fator importante relatado por GUIMARÃES (1983) é a maior resistência das moscas dos estábulos, quando comparada às moscas domésticas, pois os resultados não são tão satisfatórios no tratamento com inseticidas sobre o gado de leite e outros animais. Este fato poderia estar associado ao comportamento da mosca de não permanecer por longo período pousada no animal. Por isso, a aplicação de inseticidas, como os biológicos ou os associados, nos locais onde estes dípteros costumam pousar e se desenvolver, como cercas, muros, embaixo dos cochos, pocilgas e esterqueiras, podem vir a demonstrar melhores resultados.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO, o Manejo Integrado de Pragas – MIP é delimitado como um sistema de controle que, no contexto ambiental e da dinâmica populacional de pragas, integra técnicas e métodos que são capazes de manter a praga abaixo dos níveis economicamente prejudiciais (MOYA BORJA, 2003). Dentro deste aspecto, o controle integrado visa associar o uso dos inseticidas ao controle biológico (MCCOY; TIGANO-MILANI, 1992). Benigno (1987) destaca que para a adoção de qualquer medida de controle contra determinado inseto, se faz necessário o conhecimento de sua biologia e comportamento.

### **2.6.1 Fungos entomopatogênicos no controle de moscas**

Diferentes microorganismos têm sido pesquisados com o objetivo de verificar a capacidade entomopatogênica sobre os parasitos de importância econômica e que apresentem potencial de resistência aos inseticidas químicos disponíveis no mercado (DAVIDSON; SWEENEY, 1983). No Brasil, os estudos sobre a patologia dos insetos iniciaram-se há pouco mais de 70 anos e os trabalhos desenvolvidos com fungos entomopatogênicos, em controle microbiano, concentram-se principalmente *M. anisopliae* e *B. bassiana* (ALVES, 1998).

A espécie fúngica *Entomophthora anisopliae*, utilizada no controle das larvas de besouro *Anisoplia austriaca* (Metchnikoff, 1879), foi considerada um marco na utilização de

microorganismos com finalidade de controle populacional. Atualmente esta espécie foi reclassificada como pertence ao gênero *Metarhizium* (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são referidos por diferentes autores como os mais eficazes em programas de controle biológico (HALL; PAPIEROX, 1982). Alves (1998) menciona que destes, cerca de 80% são responsáveis pelo desenvolvimento de doenças em insetos, sendo a maioria relatada no Brasil. A sua ocorrência enzoótica como epizootica, em condições naturais, deve ser destacada como um fator na redução das populações de pragas.

Em estudo realizado por Neves e Faria (1988), foi constatado que as pupas de *S. calcitrans* foram encontradas principalmente nos meses de novembro, dezembro e janeiro. Assim, sabendo-se que a maior frequência de pupas e moscas ocorre a partir de outubro, os autores consideram que esta época seria estratégica para o controle biológico.

Avaliando-se a influência da idade como fator importante na patogenicidade dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre dípteros como *M. domestica*, *Phormia regina* e *Hylemya antiqua*, Rizzo (1977) constatou que os fungos não apresentaram patogenicidade significativa às moscas adultas. Quando observada a taxa de mortalidade, a espécie *B. bassiana* foi mais efetiva em *M. domestica* e *P. regina*, enquanto que para *H. antiqua* não houve diferença significativa. Além disso, a idade dos três dípteros utilizados não influenciou no tempo letal destes fungos entomopatogênicos.

A ocorrência natural de *B. bassiana* em *M. domestica* foi verificada por Steinkraus et al. (1990), através da coleta em fazendas de Nova York, com o isolamento e identificação deste fungo. Concluíram em seu estudo, que esta espécie poderia ser utilizada como um dos meios de controle biológico da mosca, devido à alta susceptibilidade dos adultos e a baixa viabilidade pupal das larvas expostas experimentalmente às suspensões conidiais de *B. bassiana*. Madeira (1998) isolou *E. muscae* em moscas domésticas capturadas em fazendas de Itatiba – SP, objetivando a realização de bioensaios com cepas de origem tropical.

A utilização de *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Tolyposcladium cylindrosporium* e *Verticillium lecanii* em suspensões aquosas de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios/ml em larvas de *M. domestica* foi realizada por Barson et al. (1994). Eles constataram que todas as suspensões de *T. cylindrosporium* evitaram a emergência das pupas. O mesmo ocorreu para *M. anisopliae*, nas suspensões  $10^8$  e  $10^7$  conídios/ml, enquanto que nas concentrações de  $10^6$  e  $10^5$  conídios/ml houve emergência de 1% e 16%, respectivamente. A mortalidade dos adultos foi verificada entre o sexto e nono dia pós-tratamento, onde se concluiu que a espécie *M. anisopliae* foi a mais patogênica, pois 100% das moscas adultas estavam mortas no sexto dia.

Senna-Nunes (2000) realizou o isolamento e identificação de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. e *Curvularia* sp., provenientes de moscas domésticas capturadas em ambiente natural. Senna-Nunes et al., (2002) constataram que o percentual de sobrevivência de larvas de *M. domestica* foi de 63,75% e 72,50%, após exposição a duas cepas de *P. corylophilum* na concentração de  $10^8$  conídios/ml, enquanto que a emergência das moscas provenientes destas larvas foi reduzida para 45,00% em ambas cepas.

Em trabalho experimental realizado no continente africano por Kaaya (1989), no qual espécimes de *Glossina morsitans morsitans* foram expostas a diferentes fungos entomopatogênicos, ainda na fase de larva, foi constatado que *B. bassiana* e *M. anisopliae* obtiveram maiores taxas de mortalidade e que estas aumentavam conforme a idade das moscas. Entretanto, quando as moscas foram tratadas com *P. fumoroseus* e *P. farinosus*, estes fungos ocasionaram baixas taxas de mortalidade. A dose utilizada para ocasionar a morte destas moscas também está diretamente relacionada às concentrações empregadas nas suspensões fúngicas ( $10^6$  a  $10^9$ ), embora não tenha sido observado o aumento na inviabilidade das pupas provenientes das larvas expostas a estes fungos.

Em trabalho realizado por Kaaya e Okech (1990a) foram identificados *A. niger*, *A. flavus*, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. em adultos de *G. pallidipes* capturadas na cidade de Nairobi – Kenya. Em suas pupas foram obtidas as duas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* sp. citadas acima, além de *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. e *Trichoderma* sp.

Esporos de *B. bassiana* ( $1,4 \times 10^6$  esporos/g) e *M. anisopliae* ( $2,3 \times 10^6$  esporos/g) foram misturados a areia estéril (1,0 g/litro), e em seguida, larvas de *G. morsitans morsitans* foram adicionadas. As moscas, provenientes das pupas formadas na mistura, tiveram alta mortalidade após dois a dez dias de realizada a emergência, sendo 97% ocasionada por *B. bassiana* e 80% por *M. anisopliae*. Menores concentrações de esporos (0,5g/litro de areia) resultaram em baixa mortalidade, ou seja, 60% e 40%, respectivamente (KAAYA; MUNYINYI, 1995). Este estudo teve como objetivo verificar a aplicabilidade da utilização de fungos no meio de desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca, permitindo desta forma, que novos estudos sejam desenvolvidos no controle populacional da mosca Tsetsé.

Na avaliação dos efeitos de *M. anisopliae* em *G. morsitans morsitans* e *G. morsitans centralis*, Maniania e Odulaja (1998) verificaram que ambas foram susceptíveis, principalmente as fêmeas. E ainda, constataram que as moscas mais jovens resistiram à infecção fúngica por mais tempo. Ou seja, as interações entre espécies, sexo e idade das moscas foram significativas.

Steenberg et al. (2000) realizaram levantamento a campo sobre a ocorrência natural de fungos entomopathogênicos em moscas que encontravam-se sobre o rebanho bovino. Diferentes espécies fúngicas foram isoladas, porém em baixa prevalência. Os fungos isolados foram capazes de infectar experimentalmente moscas da face (*Musca autumnalis*) e moscas do chifres (*Haematobia irritans*) em laboratório. *M. anisopliae* foi a espécie mais virulenta para a mosca da face, porém moscas domésticas expostas ao mesmo isolado se mostraram menos susceptíveis. Este fungo causou 10% e 90% de mortalidade das moscas da face após sete e quatorze dias de exposição, respectivamente. A mortalidade de 90% foi alcançada aos sete dias, quando a temperatura de 22°C foi alterada para 25°C em um segundo experimento, mostrando a importância da temperatura na atividade fúngica sobre o inseto parasitado. Estes mesmos autores destacam que o conhecimento dos fungos existentes em moscas que estão associadas ao gado, além da sua utilização experimental é necessário para a geração de informações futuras na exploração de fungos no controle biológico de moscas que afetam o rebanho bovino.

Em outro estudo, foi avaliada a patogenicidade de isolados fúngicos sobre adultos, pupas e ovos de *H. irritans* em condições laboratoriais. As moscas adultas foram susceptíveis a 23 isolados na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml. Alguns isolados de *M. anisopliae* alcançaram 100% de mortalidade dos adultos, enquanto que cepas de *B. bassiana* obtiveram até 73,75% e *P. fumoroseus* alcançou 85% de mortalidade. Cepas de *M. anisopliae* foram mais patogênicas às pupas do que as cepas das outras duas espécies, alcançando até 71,25% de mortalidade. As suspensões fúngicas foram capazes de reduzir a emergência de moscas provenientes de ovos expostos a concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/ml. Nesta concentração, cepas de *M. anisopliae* causaram mortalidade máxima de 63,75%, 50,0% e 46,25%, sendo estes percentuais maiores dos que foram obtidos em *B. bassiana* (11,25 e 43,75%) e em *P. fumoroseus* (20,0 e 27,5%). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a espécie *H. irritans* é susceptível a ação destes fungos nos estágios de larva, pupa e adulto, mas o efeito patogênico dos fungos está diretamente relacionado à cepa utilizada (ÁLGEL-SAHAGÚN et al., 2005).

Em experimento realizado por Lohmeyer e Miller (2006), adultos de *H. irritans* foram expostos a superfícies contendo conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. fumoroseus*. As moscas foram mantidas em condições controladas (25°C, 85% U.R. e fotoperíodo de 12:12 h) para a avaliação da mortalidade a cada 24 horas. Foi obtida mortalidade de 16,8% à 73% entre

os dias dois e sete após exposição ao fungo *M. anisopliae*, enquanto que a mortalidade das moscas, entre o segundo e quarto dia, foi de 9,5% para 98,4%, quando estas foram expostas a espécie *B. bassiana*. Porém, *P. fumoroseus* manteve a mortalidade similar ao controle, de 6,8% a 33,3% entre os dias dois e sete.

Os melhores resultados obtidos com *B. bassiana*, no experimento descrito acima, foram alcançados mesmo apresentando menor concentração de conídios para realização da exposição fúngica, visto que cada grama deste fungo possuía  $9,09 \times 10^8$  esporos, enquanto que para *M. anisopliae*, a concentração foi de  $4 \times 10^9$  conídios/g e para *P. fumoroseus* foi de  $1,7 \times 10^9$  conídios/g do produto. Como foram utilizados 0,5 g dos produtos comerciais para realização do bioensaio, o número de conídios aos quais as moscas foram expostas não foi similar e mesmo assim, melhores resultados foram obtidos com a utilização do primeiro fungo. Estes resultados mostram que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são patogênicos para adultos das moscas dos chifres e possuem potencial para serem utilizados em seu controle populacional (LOHMEYER; MILLER, 2006).

Poucos trabalhos sobre a utilização de agentes entomopatogênicos no controle biológico de *S. calcitrans* são encontrados e, segundo Skovgard e Steenberg (2002), pouca informação sobre a ocorrência natural de fungos entomopatogênicos nesta mosca tem sido descrita.

Cepas de *B. bassiana*, isoladas de moscas domésticas, foram utilizadas por Watson et al. (1995) no controle de *M. domestica* e *S. calcitrans*, onde verificaram a ação fúngica sobre larvas e adultos da primeira mosca e de adultos da segunda em condições laboratoriais. As moscas dos estábulos não foram tão susceptíveis às duas cepas fúngicas quando comparadas às moscas domésticas, pois somente suspensões com altas doses de  $1 \times 10^8$  conídios/cm<sup>3</sup> foram capazes de eliminar 70% e 84% das moscas expostas às cepas P89 e P90, respectivamente. Segundo estes autores, a variação da mortalidade entre as duas moscas poderia estar relacionada à diferença existente entre a composição da cutícula destas, o que resultaria em diferente susceptibilidade à infecção fúngica.

Steinkraus e Kramer (1987) conseguiram transmitir experimentalmente, em baixas proporções, *E. schizophorae* de moscas domésticas às moscas dos estábulos. Skovgard e Steenberg (2002) verificaram a prevalência de fungos entomopatogênicos em moscas doméstica e em moscas dos estábulos. Como estas duas espécies co-habitam o mesmo ambiente, estes autores relatam que isto favoreceria a ocorrência de infecção cruzada, quando as moscas estivessem descansando nas paredes ou em outras superfícies. Em seu estudo, estas moscas foram capturadas em fazenda de gado leiteiro e de suínos e mantidas em condições de laboratório. Os fungos foram isolados e identificados como *E. schizophorae* e *E. muscae*. A segunda espécie foi encontrada em baixa prevalência (4%) em *S. calcitrans*, enquanto que em *M. domestica* alcançou 90%. Outros fungos foram isolados em baixa prevalência parasitando *S. calcitrans*, como *Verticillium lecani* (0,5%) e *B. bassiana* (0,6%).

Neste mesmo estudo, a transmissão de *E. muscae* proveniente de cadáveres de *S. calcitrans* a *M. domestica* foi efetiva, a qual resultou em 50% de mortalidade, mas o inverso não foi alcançado, devido à dificuldade de criação de moscas dos estábulos em laboratório, o que dificultou a realização do experimento (Skovgard; Steenberg, 2002). Bernal et al. (2003) verificaram que suspensões de *M. anisopliae* nas concentrações de  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^8$  não foram capazes de afetar a viabilidade de larvas de segundo instar de *S. calcitrans*.

## 2.6.2 Biologia e ação de fungos entomopatogênicos em insetos

Segundo Alves (1998) a interação fungo-hospedeiro apresenta as fases de adesão, germinação, formação de apressórios, formação de grampo de penetração, penetração e colonização. A primeira fase é complexa e ocorre após a deposição do fungo sobre o inseto, com o objetivo de preparar o local de contato para a penetração. Segundo St. Leger et al.



(1991), *M. anisopliae* infecta a cutícula do hospedeiro, através de esporos que se aderem e germinam, para formar uma série de estruturas de infecção durante a penetração.

Dependendo do isolado utilizado, os deuteromicetos expostos à temperatura de 23 a 30°C e umidade relativa acima de 90%, podem iniciar a germinação a partir de 12 horas de realizada a incubação. O apressório é formado a partir da dilatação das hifas localizadas na extremidade do tubo germinativo e este inicia a fase de penetração na epicutícula e procutícula do tegumento do inseto. Nesta fase, há a influência do processo físico, realizado pela própria hifa terminal nas áreas membranosas ou esclerotizadas, e o químico, devido à produção e ação enzimática de proteases, lípases e quitinases que, agindo de forma conjunta, favorecem a penetração fúngica e o metabolismo do tubo germinativo (ST. LEGER et al., 1991; ALVES, 1998).

A partir do engrossamento da hifa, ramificação inicial no tegumento e na hemocele, a fase de colonização já está estabelecida. O encapsulamento das estruturas hifais e o seu crescimento limitado no interior do inseto são métodos adaptativos contra o sistema de defesa do hospedeiro, pois durante este processo de colonização, os fungos secretam toxinas que podem afetar as células e estimular reações celulares e humorais em sua hemocele. Assim, com a morte do inseto, o fungo obtém ambiente favorável para o crescimento e condições para que as suas hifas filamentosas invadam todos os tecidos (ALVES, 1998).

Sweetman (1936) relata que os primeiros sinais de infecção dos fungos entomopatogênicos sobre os insetos aparecem em torno de três a cinco dias após o contato dos esporos à cutícula ou ingestão. Estes sinais podem ser influenciados pela temperatura e pelo número de esporos ao qual o inseto é exposto. Alves (1998) destaca que os sintomas iniciais da doença podem aparecer como manchas escuras nas pernas, regiões intersegmentais ou distribuídas por todo o tegumento. A alimentação é interrompida e o inseto se torna enfraquecido, apresenta paralisia, perda da coordenação dos movimentos e desorientação.

Distúrbios nervosos são frequentemente observados nos últimos estágios da doença como movimentos vagarosos, perda do equilíbrio e reflexos. O crescimento micelial pode ser observado após a morte do inseto (dois a oito dias), onde se verifica o crescimento de hifas do interior ao exterior do mesmo, através dos espiráculos e cutícula do hospedeiro. Os esporos produzidos pelo fungo poderão resultar em diferentes colorações, como cinza, verde, vermelha, preta, entre outras. Além disso, o inseto torna-se rijo e mumificado (SWEETMAN, 1936; ALVES, 1998).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Localização do Experimento

O processo de preparação das suspensões fúngicas e os bioensaios foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária. A formação da colônia de *S. calcitrans* foi realizada no Laboratório de Pesquisa de Dípteros Hematófagos. Ambos laboratórios estão localizados na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

### 3.2 Criação de *Stomoxys calcitrans* em Condições Laboratoriais

#### 3.2.1 Obtenção de exemplares de moscas adultas

As moscas adultas de *S. calcitrans* foram capturadas, independentemente do sexo, em bovino pertencente ao Hospital Veterinário de Grandes Animais, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A captura foi realizada neste local, devido ao grande número de moscas disponíveis, facilidade de acesso e manipulação do bovino. A maioria das moscas apresentava abdome ingurgitado com o sangue do mesmo. Estas foram capturadas, utilizando-se rede entomológica (BRITO, 2000), armazenadas em gaiola plástica de transporte e identificadas segundo Furman e Cats (1982).

#### 3.2.2 Gaiolas entomológicas

Inicialmente, para criação de *S. calcitrans* em condições laboratoriais, foram utilizadas gaiolas de madeira (30 cm x 30 cm x 30 cm) cobertas nas laterais e teto com tela de nylon, como descrito por Christmas (1970) e Brito (2000), mas houve a necessidade de serem substituídas por gaiolas de material plástico, modificando-se o modelo descrito pelo autor (CHRISTMAS, 1970). A gaiola maior (60 cm x 40 cm x 50 cm) foi destinada à criação de moscas, enquanto que a menor (15 cm X 15 cm X 20 cm) foi utilizada no transporte ou para a obtenção de adultos em câmara climatizada (B.O.D.).

Para a gaiola de criação, o fundo da caixa plástica foi retirado. Em seguida, tela de nylon branca foi colada neste fundo e na parte superior. Assim, com a caixa de cabeça para baixo, era possível colocar o papel pardo na tampa e acomodar a caixa por cima desta. A ventilação deste novo modelo era realizada pelo teto da gaiola, onde a tela de nylon foi fixada.

Foi realizado um orifício em torno de 20 cm<sup>2</sup> na lateral mais estreita da caixa, permitindo o acesso ao interior da gaiola para o fornecimento de água e sangue. Um tecido de algodão claro foi fixado nesta entrada, de tal forma que ficasse em formato tubular para evitar a fuga das moscas no momento da introdução da mão do tratador. Um elástico na ponta deste tecido foi utilizado para melhorar a fixação do tecido ao punho do manipulador.

Para atenuar o estresse na gaiola de criação, a caixa possuía medidas maiores que as recomendadas por Christmas (1970), além disso, pedaços de 20 cm de barbante foram pendurados no interior da gaiola e metade da mesma foi coberta com papel pardo.

A caixa destinada à gaiola de transporte ou para obtenção de adultos em B.O.D. foi telada somente na tampa, e em uma das laterais foi realizado um orifício, seguindo o que foi descrito para a gaiola de criação de moscas.

Para evitar a entrada de outros insetos pela tela de ventilação, esta foi coberta com um tecido branco fino fixado nas laterais com fita adesiva, sem que entrasse em contato com a tela de nylon. Isto não foi realizado nas gaiolas pequenas, pois estas permaneciam no interior da B.O.D. ou quando utilizadas para o transporte, as moscas permaneciam por pouco tempo.

A captura das moscas no interior das gaiolas era realizada com auxílio de um tubo de ensaio de centrífuga (100 mm x 15 mm de diâmetro). Para transferência de grande número de moscas das gaiolas de transporte para as gaiolas de criação, o modelo da caixa de transporte permitia que a porção, onde está localizada a tampa, fosse acomodada no interior do tecido tubular da caixa de criação de moscas. Desta forma, a tampa era suavemente deslocada, permitindo a passagem de todas as moscas capturadas para a gaiola de criação.

### **3.2.3 Temperatura e umidade**

Um termômetro digital foi colocado sobre a gaiola e no interior da B.O.D., com intuito de se obter a temperatura e umidade relativa atual, máxima e mínima diária. A temperatura e umidade foram conferidas diariamente, tanto nas gaiolas mantidas sobre a bancada, como as mantidas na B.O.D.

Para a manutenção da temperatura das gaiolas de criação, foi utilizada lâmpada incandescente de 200W, acesa todo o tempo, enquanto que as gaiolas pequenas para obtenção de adultos e os meios de desenvolvimento larval foram mantidos em câmara climatizada a  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  e em torno de 70 – 80% de umidade relativa. Os valores médios, máximos e mínimos de temperatura e umidade relativa estão relacionados ao período de criação das moscas.

### **3.2.4 Limpeza da gaiola**

Uma folha de papel pardo foi colocada no fundo da gaiola e trocada diariamente, para facilitar a coleta de ovos e limpeza da gaiola. Semanalmente, com o auxílio de esponja úmida e papel toalha, foi realizada a retirada das fezes acumuladas nas paredes das gaiolas plásticas, tendo-se o cuidado de não deixar gotículas de água para evitar a aderência da mosca à parede da gaiola e conseqüente morte.

### **3.2.5 Obtenção e fornecimento de sangue**

O sangue utilizado na dieta das moscas foi proveniente de bovinos abatidos em matadouro no município de Barra Mansa – RJ, no qual foi adicionado citrato de sódio a 0,38% (BENIGNO, 1987; WATSON et al., 1995). Este foi transportado em garrafa tipo “pet” de dois litros ao laboratório, para em seguida, ser transferido para pequenos sacos plásticos (4 cm x 20 cm) e armazenados em freezer. O sangue a ser fornecido pela manhã (entre 8:00 e 9:00 horas) era retirado do freezer no dia anterior e armazenado no refrigerador para que descongelasse lentamente.

O sangue descongelado era transferido a um Becker para ser aquecido em banho-maria (em torno de  $37^\circ \text{C}$ ), simulando a temperatura corporal do animal parasitado (MELLO, 1989). Este alimento foi fornecido em almofada de gaze às moscas adultas. Para confecção da almofada, duas gazes eram colocadas lado a lado e uma terceira envolvia estas duas. Caso houvesse algum coágulo de sangue formado, este era depositado no fundo da placa de Petri e a almofada era colocada por cima para, em seguida, o sangue ser acrescentado. O sangue deveria permanecer no interior da gaze para que as moscas não ficassem presas.

### **3.2.6 Fornecimento de água**

A água filtrada fornecida às moscas foi armazenada em Erlenmeyer (50 ml) com duas gazes enroladas e introduzidas neste, tendo-se o cuidado em deixar uma extremidade da gaze em contato com o fundo do recipiente e a outra parte exposta. Esta água foi trocada de dois em dois dias. O novo método substituiu o anteriormente adotado, o qual foi utilizada placa de Petri pequena contendo algodão embebido com água filtrada e um tubo de ensaio, de 100 milímetros de altura e 25 mm de diâmetro, repleto de água emborcado sobre este algodão (LYSYK, 1998).

### **3.2.7 Dieta para desenvolvimento larval e pupal**

Para a obtenção de larvas e pupas foi utilizado o meio desenvolvido por Christmas (1970) e adaptado por Macedo (2001). Este foi composto por cana-de-açúcar (66g), farelo de trigo (25g), bicarbonato de sódio (1g) e água destilada (127ml). A farinha de carne (8g) foi substituída por carne moída, em mesma quantidade, pois esse ingrediente não está disponível no mercado.

Para a preparação da mistura, o interior do bagoço da cana-de-açúcar foi retirado, cortado em pedaços menores e triturado no liquidificador, obtendo-se desta maneira, um farelo grosso. Em seguida, os componentes citados acima foram adicionados e homogeneizados.

A dieta foi armazenada em Becker de vidro de 600 ml, em torno de 50g, o que resultou em uma mistura com altura máxima de sete centímetros. Os recipientes foram cobertos com tecido de algodão branco e amarrados com barbante (CHRISTMAS, 1970). Já a mistura destinada à exposição fúngica de ovos e larvas, foi armazenada em tubos de ensaio de vidro (200 mm X 25 mm de diâmetro) e fechados com rolha de algodão hidrófilo revestido com tecido fino.

Os recipientes foram colocados em saco de polipropileno, e autoclavados (120°C/20 minutos). Posteriormente, estes foram armazenados em refrigerador. A cana-de-açúcar e carne bovina moída não utilizadas no momento da preparação do meio de desenvolvimento larval foram armazenadas em sacos de polipropileno e congeladas.

### **3.2.8 Contaminação fúngica**

Os fungos contaminantes, provenientes da gaiola de madeira e do meio de desenvolvimento larval, foram repicados, com auxílio de alça de platina, em placa de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) e estas incubadas a 25°C ± 1, 70 - 80% U.R. em B.O.D. Após crescimento fúngico, o material foi encaminhado para o Departamento de Micologia da FIOCRUZ, onde foi realizada a identificação.

Os fungos enviados foram repicados para tubo de vidro com tampa contendo meio de cultura BDA, e identificados através da observação das características macroscópicas e microscópicas, levando em consideração as características da colônia, tais como: crescimento, aparência da superfície da colônia, cor e exame microscópico das estruturas de reprodução em exame de lâmina direta, utilizando-se Lactofenol de Amman acrescido de azul de algodão. Estas foram observadas sob microscópio óptico (400 e 1000X) (ALVES, 1998).

### **3.2.9 Obtenção de ovos**

Os ovos foram coletados e contados diariamente, no momento do fornecimento do sangue para alimentação. Benigno (1987) e Mello (1989) relatam que a própria gaze utilizada no fornecimento de sangue pode ser considerada como um meio para oviposição, principalmente quando as placas permanecem na gaiola por mais de 24 horas. Segundo Mello (1989), o sangue se torna envelhecido, entra em decomposição e libera vapores amoniacais que estimulam a postura.

Os ovos, muito aderidos ou quando em grande quantidade, foram retirados através da imersão da gaze em cálice de vidro com água destilada estéril. Após alguns minutos, os ovos acumulados no fundo do cálice permitiam o descarte do sobrenadante e acréscimo de mais água destilada estéril, até que o conteúdo do cálice se tornasse límpido, como descrito por Mello (1989).

### **3.2.10 Obtenção das larvas**

O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção dos ovos. Com uma seringa de insulina, a água destilada residual foi retirada e os ovos transferidos para a mistura de

desenvolvimento larval. Desta forma, se evitou que a água destilada fosse despejada na mistura, reduzindo assim, a chance de proliferação fúngica contaminante.

Os métodos adotados por Benigno (1987) onde ovos são transferidos para a mistura, com o auxílio de uma pipeta acoplada a uma pêra de borracha e as larvas de primeiro instar são obtidas através da pré-incubação de ovos em placa de Petri de vidro com papel filtro úmido foram abandonados, devido a proliferação de fungos contaminantes e a morte das larvas.

Para a determinação da idade, algumas larvas foram utilizadas para observação dos espiráculos respiratórios com objetivo de determinar o dia da coleta das larvas para realização do bioensaio. A literatura menciona a utilização de larvas de *M. domestica* com 72 horas de vida. Watson et al. (1995) e Lecuona et al. (2005) utilizaram larvas de mosca doméstica de segundo e terceiro instar para a exposição fúngica, respectivamente. Este procedimento foi realizado sem sucesso no presente estudo, pois as larvas de *S. calcitrans* são extremamente frágeis e sua manipulação resultou em grande número de larvas mortas. Por esta razão, foram utilizadas larvas com nove dias de desenvolvimento para realização do bioensaio.

Ao nono dia, a mistura foi despejada em bandeja plástica e as larvas foram coletadas cuidadosamente com o auxílio de pinça entomológica e pincel fino para realização do bioensaio.

### **3.2.11 Obtenção das pupas**

Realizada a deposição dos ovos na dieta, como descrito acima, foram aguardados 16 dias para a retirada das pupas presentes na mistura para realização do bioensaio. Da mesma maneira, a mistura foi despejada em bandeja plástica e as pupas foram coletadas com auxílio de pinça entomológica.

### **3.2.12 Obtenção de adultos**

Para a obtenção de adultos, as pupas foram coletadas no vigésimo dia de desenvolvimento. Estas foram depositadas em placas de Petri (WATSON et al., 1995), no interior de gaiolas plásticas pequenas, em B.O.D., até a emergência dos adultos (BRITO, 2000). Benigno (1987) manteve as pupas em câmara climatizada, para posterior transferência dos adultos recém-emergidos para gaiolas de madeira telada de nylon. Assim, as pupas se desenvolvem em condições controladas de temperatura e umidade, e ainda facilita a determinação do dia de emergência.

## **3.3 Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***

### **3.3.1 Obtenção da amostra fúngica**

O fungo utilizado no teste *in vitro* foi *Metarhizium anisopliae*, cepa 959, isolado previamente de cigarrinha das pastagens (*Mahanarva posticaata*) e testada no carrapato *Boophilus microplus* no Rio de Janeiro. Este fungo é mantido pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz ESALQ-USP e pelo Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### **3.3.2 Elaboração das suspensões fúngicas**

A elaboração da suspensão fúngica foi realizada em fluxo laminar, e próximo ao bico de Bunsein, onde o fungo *M. anisopliae* foi inoculado em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA). Estas foram armazenadas em câmara climatizada com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70-80% de umidade relativa. Após quinze dias de inoculação, as placas apresentaram crescimento fúngico suficiente para o fornecimento de dois quadrados de  $1\text{ cm}^2$  do meio para serem depositados em arroz (ALVES, 1998).

Para a produção de conídios foi utilizado arroz parboilizado. Porções de 60g de arroz foram separadas em sacos de polipropileno, onde foram acrescentados 30 ml de água destilada. Estes sacos foram lacrados com barbante e autoclavados por 20 minutos a 120°C. Após resfriamento, inocularam-se, em câmara asséptica de fluxo laminar, dois quadrados do meio contendo o fungo esporulado. Os sacos foram homogeneizados diariamente, permanecendo em câmara climatizada nas mesmas condições das placas até que todo arroz se apresentasse colonizado e esporulado, ou seja, apresentasse uma cobertura pulverulenta verde (ALVES, 1998; LECUONA et al., 2005).

Para a elaboração das suspensões fúngicas, uma porção de arroz semeado foi depositada em Becker estéril, acrescentando-se 50 ml de água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 (0,01%). Após um minuto de agitação intensa, com o auxílio de uma pipeta plástica estéril, a suspensão foi despejada em outro Becker contendo gaze estéril, com o intuito de se retirar partículas maiores provenientes do arroz.

Para homogeneização, foi realizada agitação manual da suspensão, e em seguida, prosseguiu-se com a contagem dos conídios em Câmara de Newbauer, através da utilização de microscópio óptico. Entre cada contagem, a Câmara de Newbauer foi lavada, enxaguada e seca (ALVES, 1998).

A média da contagem por campo (n) foi multiplicada por um fator fixo ( $n \times 4 \times 10^6$ ), o que determina o número de conídios existentes na suspensão (ALVES, 1998). A utilização desta metodologia teve como objetivo a preparação da suspensão na concentração de  $10^8$  conídios/ml e as sucessivas diluições nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios/ml (BARSON et al., 1994; ALVES, 1998; SENNA-NUNES et al., 2002). Foram utilizados tubos plásticos de centrifugação (50 ml) com tampa de rosca para realização das diluições, ou seja, a concentração  $10^7$  foi obtida a partir da suspensão na concentração  $10^8$ , onde 1 ml desta foi adicionado em 9 ml de água destilada estéril com espalhante adesivo Tween 80 (0,01%) (LECUONA et al., 2005). Este procedimento foi realizado para as diluições subseqüentes (WATSON et al., 1995; SENNA-NUNES et al., 2002).

### **3.4 Bioensaio**

Os bioensaios foram elaborados para avaliar o potencial entomopatogênico de *M. anisopliae* em ovos, larvas e pupas de *S. calcitrans* em condições controladas, adaptando-se a metodologia para a espécie em estudo (STEINKRAUS et al., 1990; BARSON et al., 1994; SENNA-NUNES et al., 2002). Também foram realizados bioensaios com o objetivo de avaliar o método de exposição de ovos a ação parasitária do fungo *M. anisopliae*.

Somente foram utilizados indivíduos obtidos no dia da realização do experimento, mantendo-se assim a homogeneidade dos indivíduos expostos ao bioensaio.

#### **3.4.1 Utilização de grupos controle**

Para cada bioensaio, foram utilizados dois grupos controles. O grupo denominado controle negativo, não recebeu qualquer tratamento para observação do comportamento biológico entre os indivíduos tratados e os não tratados. E o grupo controle positivo foi exposto ao diluente utilizado na suspensão fúngica, ou seja, água destilada estéril acrescida de Tween 80 (0,01%), para verificar possível influência do diluente sobre o desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca. Os controles foram mantidos nas mesmas condições que os grupos experimentais expostos às suspensões aquosas de *M. anisopliae* (SENNANUNES et al., 2002).

#### **3.4.2 Exposição *in vitro* de estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans***

Para facilitar a transferência dos ovos e larvas para os respectivos meios de desenvolvimento foram utilizados pincel fino e seringa de insulina em estilete, enquanto que

as pupas foram transferidas com o auxílio de pinça entomológica. Todos os tubos de ensaio e placas de Petri, contendo os estágios imaturos de *S. calcitrans*, foram mantidos em câmara climatizada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 70-80% U.R., até que fosse realizada a contagem das larvas, pupas e adultos formados.

Em estudo realizado por Mello e Garcia (1988), foi obtido um número máximo de 508 ovos e um mínimo de 317 ovos com 93,3% e 80,2% de eclodibilidade, respectivamente. Estas moscas foram criadas a  $27^{\circ}\text{C}$  e 70 a 80 % de umidade relativa e alimentadas com sangue bovino citratado. Estes dados serviram como base para a determinação do número de ovos a serem expostos à ação fúngica, considerando-se o percentual de eclodibilidade.

#### **3.4.2.1 Métodos de exposição dos ovos as suspensões fúngicas**

Para a exposição dos ovos ao fungo em diferentes concentrações, três métodos distintos foram realizados, com o objetivo de se ajustar uma metodologia de bioensaio para condições laboratoriais (BERNAL et al., 2003). A variação ocorrida entre o número de ovos obtidos para compor os grupos de cada bioensaio está relacionada à possibilidade de utilização de todos os ovos coletados no dia da exposição fúngica, pois a análise dos dados não foi afetada, devido ao teste estatístico utilizado (SAMPAIO, 2002).

No primeiro bioensaio 468 ovos foram utilizados. A suspensão fúngica foi preparada na concentração de  $2,2 \times 10^8$  conídios/ml e sucessivas diluições nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios/ml. Cada grupo de 78 ovos foi imerso, por dois minutos, nas suas respectivas suspensões. Dois grupos de 78 ovos foram destinados ao grupo controle positivo e negativo. Em seguida, todos os grupos foram transferidos de sua suspensão à placa de Petri estéril, contendo algodão hidrófilo úmido. Após dez dias de exposição ao fungo, a contagem das larvas formadas foi realizada, adaptando-se a metodologia para o estágio e espécie estudada (WATSON et al., 1995; SENNA-NUNES et al., 2002). Neste bioensaio tentou-se realizar a exposição fúngica de ovos e contagem de larvas formadas não alimentadas (BARSON et al. 1994).

O segundo bioensaio foi realizado como o primeiro, ou seja, 80 ovos foram imersos na suspensão fúngica na concentração de  $2,3 \times 10^8$  conídios/ml, assim como para as sucessivas diluições, totalizando 480 ovos utilizados neste bioensaio. Após exposição fúngica, estes ovos foram transferidos para tubos de ensaio, de 200 mm x 25 mm de diâmetro, contendo dez centímetros de altura da mistura de desenvolvimento larval, devido a necessidade da utilização deste meio para alimentação das larvas, adaptando-se a metodologia descrita por Watson et al. (1995). Após dez dias de incubação as larvas formadas foram retiradas do meio de desenvolvimento larval e contadas com auxílio de microscópio estereoscópico.

No terceiro bioensaio foram obtidos 600 ovos e utilizada a concentração fúngica de  $2,1 \times 10^8$  conídios/ml. Cada grupo de 120 ovos foi transferido para um tubo de ensaio contendo a mistura para desenvolvimento larval. Em seguida, dois mililitros de cada concentração da suspensão fúngica foi gotejada, com auxílio de pipeta descartável e pêra, em toda superfície do meio contendo os ovos. Estes tubos foram armazenados em B.O.D. por dez dias, para a contagem de possíveis larvas formadas. O método de gotejamento foi adaptado a partir de trabalhos que misturam o fungo ao meio de desenvolvimento larval (KAAYA; MUNYINYI, 1995; WATSON et al., 1995). Este foi utilizado para verificar a influência da metodologia de exposição dos ovos ao fungo.

#### **3.4.2.2 Exposição de larvas as suspensões fúngicas**

Grupos de 61 larvas com nove dias de desenvolvimento foram imersos na suspensão fúngica na concentração de  $2,1 \times 10^8$  conídios/ml e sucessivas diluições, enquanto dois grupos foram destinados aos controles positivo e negativo. Após exposição, as larvas foram transferidas para os respectivos tubos de ensaio contendo a mistura para desenvolvimento

larval. As pupas formadas foram contadas no décimo dias após realização da exposição das larvas.

As pupas formadas foram transferidas para placas de Petri estéril para contagem de adultos emergidos até o 10<sup>o</sup> dia após transferência. Como a metodologia descrita por Senna-Nunes et al. (2002) foi utilizada para mosca doméstica, esta teve que ser adaptada para a espécie avaliada, pois a mosca dos estábulos necessita de um meio para o desenvolvimento larval e este, não permite a realização da contagem diária de larvas mortas sem que a manipulação afete os resultados. Com isso, não foi possível a avaliação da mortalidade acumulada em intervalos de tempo pré-determinados.

### **3.4.2.3 Exposição de pupas as suspensões fúngicas**

Neste bioensaio, 30 pupas formadas ao décimo sexto dia foram imersas por dois minutos na concentração de  $2,3 \times 10^8$  conídios/ml, assim como para as respectivas diluições (BARSON et al.,1994). Foram utilizadas 180 pupas neste bioensaio. Após a exposição fúngica, todos os grupos foram transferidos para placas de Petri estéreis e a contagem de moscas adultas formadas foi realizada no décimo dia após exposição (LECUONA et al., 2005).

Para realização da contagem das moscas, as placas foram armazenadas por dois minutos em congelador para que a atividade biológica das moscas emergidas diminuísse, facilitando assim a manipulação.

### **3.5 Viabilidade Conidial das Suspensões Fúngicas**

Com o auxílio de uma pipeta, foram coletados dez microlitros de suspensão fúngica em cada bioensaio, com o objetivo de avaliar a viabilidade dos conídios utilizados no experimento. Estas alíquotas foram transferidas a duas placas de Petri contendo BDA e antibiótico (estreptomina na base de 500 mg/litro). As placas foram incubadas por 24 horas em câmara climatizada ( $25 \pm 1^{\circ}$  C, 70-80% U.R.). A leitura foi realizada em microscópio óptico, onde se fez a contagem dos conídios germinados e dos não-germinados em faixas correspondentes ao diâmetro vertical e horizontal do campo observado. O resultado foi obtido em porcentagem de germinação, onde o número de conídios germinados foi dividido pelo total de conídios contados e o resultado multiplicado por 100 (ALVES, 1998).

### **3.6 Contagem de Indivíduos Expostos às Suspensões Fúngicas**

Para a contagem dos indivíduos existentes, a mistura de desenvolvimento larval de cada tubo foi transferida para placa de Petri (150 mm de diâmetro). Os indivíduos foram separados e contados, com auxílio de estilete e pinça entomológica. Uma segunda contagem foi realizada, com o auxílio de microscópio estereoscópico, para que nenhuma larva permanecesse na mistura. Para a contagem das pupas o equipamento não foi utilizado, pois estas são facilmente visualizadas.

### **3.7 Confirmação da Ação Fúngica sobre os Indivíduos Expostos**

Os indivíduos mortos encontrados foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (1%) por três minutos, e em seguida, lavados por duas vezes em água destilada estéril (um minuto em cada lavagem), como realizado por Senna-Nunes (2000). Após lavagem, estes foram armazenados em câmara úmida para proliferação fúngica, possibilitando desta forma, a visualização em microscópio estereoscópico, das características macroscópicas do fungo. Observado o crescimento, estes fungos foram semeados entre lâmina e lamínula contendo meio seletivo composto de ágar aveia, dodine (acetato de n-dodecylguanidina), benomil (Benlate 50WP, E. I. Dupont Nemours, Inc., Wilmington, DE) e clortetraciclina (CHASE et al., 1986). Estes foram mantidos em câmara climatizada por dez dias, para observação do



micélio e identificação da espécie fúngica utilizada no bioensaio (RIVALIER; SEYDER, 1932 apud SENNA-NUNES, 2000).

Foram considerados como indivíduos vivos àqueles que, expostos a diferentes concentrações fúngicas, foram capazes de passar para o estágio de desenvolvimento seguinte, ou seja, quantos ovos utilizados no bioensaio foram capazes de se tornar larvas, quantas larvas expostas se tornaram pupas e quantas pupas se tornaram adultos. E ainda, nas larvas que se tornaram pupas, quantas destas se tornaram adultos.

Também foi avaliado se existia diferença entre a forma de exposição dos ovos ao fungo, ou seja, se ocorreu diferença entre o método de imersão na suspensão fúngica e o método de adição da suspensão sobre o meio de desenvolvimento larval contendo os ovos. E ainda, após exposição dos ovos por imersão, se houve diferença entre depositá-los na mistura de desenvolvimento larval ou no algodão úmido.

### 3.8 Análise Estatística

A correção da mortalidade da testemunha dos ovos expostos foi realizada utilizando-se a fórmula Abbott (ALVES, 1998).

Fórmula de Abbott:

$$\% \text{ da mortalidade corrigida} = \frac{\% \text{ da mortalidade do tratamento} - \% \text{ da mortalidade da testemunha}}{100 - \% \text{ da mortalidade da testemunha}} \times 100 =$$

Foi utilizado o Teste de Qui-quadrado ( $X^2$ ) com o objetivo de verificar o percentual de mortalidade existente entre as suspensões fúngicas nas concentrações  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  conídios/ml, controle positivo e controle negativo e a ocorrência de diferença significativa entre estes tratamentos em cada estágio imaturo de desenvolvimento da mosca. Também foi utilizado para comparar os diferentes métodos de exposição dos ovos, comparar a mortalidade ocorrida entre ovos e larvas expostos por imersão, comparar a ocorrência de diferença entre a emergência de adultos provenientes de pupas expostas às suspensões fúngicas e de pupas provenientes de larvas expostas ao fungo. E ainda, foi verificada a existência de diferença significativa entre os estágios imaturos, os relacionando às maiores concentrações fúngicas utilizadas ( $p=0,05$ ) (SAMPAIO, 2002; LECUONA et al. 2005).

Fórmula do  $X^2$ :

$$X^2 = \sum \frac{(\text{frequência observada} - \text{frequência esperada})^2}{\text{frequência esperada}} =$$

Em seguida, as frequências foram avaliadas pela Fórmula de Prevalência e Desvio Padrão com a finalidade de confirmar a existência de diferença significativa entre os percentuais de mortalidade obtidos (SAMPAIO, 2002).

Fórmula de Prevalência e Desvio Padrão:

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{Número de indivíduos mortos}}{\text{Número de indivíduos expostos}} =$$

$$\text{Desvio Padrão} = \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} =$$

p = prevalência

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Formação de Colônia de *Stomoxys calcitrans*

#### 4.1.1 Gaiolas entomológicas

A gaiola descrita por Christmas (1970) e Brito (2000) não foi utilizada até o término do experimento, devido aos problemas ocorridos com relação à proliferação fúngica na estrutura de madeira, principalmente após realização da limpeza da gaiola, pois a umidade favoreceu o desenvolvimento fúngico. Além disso, a colocação de bandeja com água nos pés da gaiola, com o intuito de evitar a entrada de formigas atraídas pelo sangue e ovos, também contribuiu para o desenvolvimento de fungos contaminantes.

Algumas gaiolas apresentavam vidro transparente em uma das laterais ao invés de tela de nylon. Isso ocasionou estresse às moscas, pois estas se chocavam no vidro na tentativa de fuga, o que resultou em morte de algumas moscas. Além disso, pela estrutura ter sido feita de madeira, quando uma das moscas encontrava alguma fresta, estas tentavam ultrapassá-la constantemente, o que também resultou em morte.

Como as gaiolas apresentavam-se teladas em suas laterais, as moscas permaneciam por mais tempo pousadas nestas, principalmente nos lados onde havia maior incidência de luz. Isso resultava em perda de ovos para o exterior da gaiola, quando as moscas realizavam a postura. Ainda havia a dificuldade de visualização das moscas quando a gaiola era totalmente telada, o que prejudicou a limpeza e a captura de moscas em seu interior.

A utilização de tela de nylon cobrindo a maior parte da gaiola de madeira favorecia a ventilação, mas também permitia a entrada de outros pequenos insetos atraídos pelo sangue. Além disso, este modelo não fornecia um local fresco e sombreado para que as moscas descansassem após a alimentação, pois foi necessário o fornecimento de luz permanente para a manutenção da temperatura e para melhorar a atividade metabólica das mesmas.

O fundo das gaiolas de madeira era forrado com papel pardo e este deveria ser trocado diariamente para retirada das fezes e coleta de ovos. As gaiolas não ofereciam um método prático para retirada deste papel, e com isso, ocasionava grande estresse às moscas e até morte por esmagamento, pois o acesso ao papel era realizado pelo interior da gaiola.

Os dois modelos de gaiolas plásticas transparentes (Figura 1 e 2), baseadas no modelo descrito por Christmas (1970), favoreceram a criação e a manutenção das moscas. O acesso ao papel no fundo da gaiola foi facilitado, pois a retirada dos excrementos era realizado pelo lado de fora da gaiola. Além disso, a utilização da tampa da caixa como apoio ao papel pardo permitia que a gaiola fosse colocada no interior de uma bandeja com água sem que molhasse este papel.

Outra vantagem da nova gaiola foi o aproveitamento total dos ovos postos, pois como a fixação de tela de nylon foi realizada apenas na parte superior da gaiola, o problema relacionado à perda de ovos pelas laterais da gaiola descrita por Christmas (1970) deixou de existir.

O estresse gerado em qualquer experimento, onde insetos são acomodados em área limitada, foi reduzido, pois a nova gaiola de criação ofereceu uma área maior que a recomendada por Christmas (1970). E ainda, os barbantes fixados no interior da gaiola associados à existência de uma área sombreada permitiram que as moscas ficassem pousadas em local mais adequado para seu descanso, pois foi disponibilizado conforto com relação à umidade, temperatura e local sombreado para repouso após alimentação.

A substituição por gaiolas de material plástico transparente também favoreceu a cap-



**Figura 1.** Gaiola plástica destinada à criação de adultos e obtenção de ovos de *S. calcitrans* em condições laboratoriais.



**Figura 2.** Gaiola plástica destinada ao transporte de adultos de *S. calcitrans* capturados ou para acondicionamento de pupas em câmara climatizada.

turadas moscas no interior da gaiola. Assim as moscas podiam ser transferidas sem o risco de serem lesadas. Além disso, os dois modelos ofereceram condições para que um grande número de moscas pudessem ser transferidas rapidamente da gaiola de transporte para as gaiolas de criação, o que agilizou o manejo.

#### **4.1.2 Temperatura e umidade**

Com auxílio de lâmpada incandescente de 200W, acesa todo o tempo, as gaiolas foram mantidas, em média a 26,05 °C. A média da temperatura máxima e mínima foi de 26,8°C e 24,02°C, respectivamente. Já a umidade relativa média, máxima e mínima foi de 74,2%, 81,1% e 63,6%. Estes valores estão relacionados ao período de criação das moscas, ou seja, entre abril à outubro de 2006. Estes resultados são similares aos encontrados em trabalhos realizados na própria universidade, os quais informam terem mantido as moscas a 27°C e 70 – 80 % de umidade relativa (BENIGNO, 1987; MACEDO, 2001). MELLO (1989) verificou que os parâmetros climáticos de Seropédica são de 18°C e 27° C e umidade relativa entre 70 – 80 %, sendo estes favoráveis ao desenvolvimento de *S. calcitrans* no ambiente.

Ovos, larvas, pupas e moscas recém-emergidas foram mantidas, em média, a temperatura de 26,8°C (máxima de 27,8°C e mínima de 26,1°C) e umidade relativa a 82,2% (máxima de 89,8% e mínima de 59,4%) em câmara climatizada. Segundo Sutherland (1978), a taxa de viabilidade dos ovos expostos a temperaturas entre 10° e 40°C superou os 84%, mas se tornou letal quando a temperatura chegou a 45°C. A faixa de 20° a 30°C demonstra ser mais favorável ao desenvolvimento larval e pupal, pois quando estes limites são ultrapassados há aumento da mortalidade, principalmente aos 15°C.

#### **4.1.3 Fornecimento de sangue**

Após modificação da gaiola e adaptação da almofada de gaze, o manejo no interior da gaiola limitou-se ao fornecimento de alimento e água, pois foi solucionado o problema da retirada do papel pelo interior da gaiola. Além disso, a ocorrência de morte das moscas por submersão no sangue citratado deixou de existir, pois a camada mais grossa de gaze mantinha o sangue em condições para ser ingerido, sem que houvesse risco de morte por afogamento.

A adição do coágulo de sangue resultava em odor amoniacal mais intenso, o que estimulou a postura das moscas, além disso, a adição da almofada de gaze contendo sangue bovino citratado (Figura 3) no interior da gaiola, disponibilizou um bom local para oviposição (BENIGNO,1987; MELLO,1989).

Diferindo do ocorrido com Mello (1989), as moscas rapidamente se adaptaram a forma de alimentação relatada, desde que o sangue se apresentasse aquecido e fosse fornecido no interior da gaiola (BENIGNO, 1987; MELLO, 1989), pois a simples deposição da gaze com sangue sobre a parte superior da gaiola telada, descrita por Macedo (2001) ou a na lateral da mesma (CHRISTMAS, 1970) não foram tão efetivas.

#### **4.1.4 Fornecimento de água**

A redução da ocorrência de morte por afogamento também ocorreu quando o método de fornecimento de água foi substituído, pois a água filtrada fornecida em Erlenmeyer com gaze, disponibilizou a água por capilaridade às moscas (Figura 4). Assim, a água filtrada se tornava disponível às moscas, mas sem o risco de ocorrer afogamento. O novo método substituiu o anteriormente adotado, onde foi utilizada uma pequena placa de Petri contendo algodão embebido com água filtrada e um tubo de ensaio (100 milímetros de altura e 25 mm de diâmetro) repleto de água emborcado sobre este algodão. Assim, o algodão permanecia



**Figura 3.** Placa de Petri contendo almofada de gaze para o fornecimento de sangue bovino citratado aos adultos de *S. calcitrans*, como fonte de alimento e local pra oviposição.



**Figura 4.** Água filtrada fornecida em Becker de vidro e gaze para adultos de *S. calcitrans* criadas em condições laboratoriais.

úmido o suficiente para as moscas ingerirem água, mas também favoreceu a ocorrência de afogamentos. Esta forma de fornecimento de água é similar ao descrito por Lysyk (1998) para o fornecimento de água com sacarose (10%).

#### **4.1.5 Dieta para desenvolvimento larval**

Somente o interior do bagaço da cana-de-açúcar foi utilizado para a preparação da mistura, pois se trata da parte mais macia e menos fibrosa, o que favoreceu no processo de trituração e mistura aos outros componentes.

Os tubos de ensaio contendo o meio de desenvolvimento larval destinados aos bioensaios foram fechados com rolha de algodão hidrófilo revestido com tecido fino, o que evitou a contaminação externa, sem impedir a entrada de oxigênio. E ainda, o revestimento do algodão impediu o aprisionamento das larvas.

Segundo Barson et al. (1994), a ocorrência da contaminação por diferentes patógenos está relacionada ao fornecimento de dietas para o desenvolvimento de moscas em laboratório. Por esta razão, os recipientes foram colocados em saco de polipropileno, autoclavados a 120°C por 20 minutos e armazenados em refrigerador.

#### **4.1.6 Contaminação fúngica**

Ao iniciar o processo de criação de moscas em condições laboratoriais, ocorreram problemas relacionados à proliferação fúngica na estrutura de madeira das gaiolas, principalmente após a limpeza, e em alguns recipientes onde foram acondicionados o meio de desenvolvimento larval. Os contaminantes fúngicos isolados foram identificados como *Aspergillus* seção *nigri*, *Neurospora crassa* e *Penicillium* sp. O primeiro fungo apresentava crescimento hifal algodinoso fino e de coloração branca, que com o passar dos dias, desenvolvia uma cobertura de aspecto pulverulento, espesso e preto. O segundo fungo desenvolveu hifas abundantes, mais finas e brancas e de crescimento intenso, onde rapidamente foi obtido um crescimento pulverulento fino de cor laranja. Já o terceiro fungo, possuía crescimento pulverulento fino e de coloração verde musgo.

Estes fungos são encontrados comumente no ambiente. Em levantamento de fungos existentes no solo, Sarquis e Oliveira (1996) obtiveram fungos filamentosos, identificados como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Pelagatti et al. (1993) também verificaram o predomínio de *Aspergillus* spp em vários insetos coletados em seu estudo, assim como Senna-Nunes et al. (2002) em moscas domésticas. Steinhaus (1946) relata que a alta umidade seria um dos fatores envolvidos na germinação e desenvolvimento dos esporos. Associado a isto, a disponibilidade de substrato presente na mistura, poderia favorecer o desenvolvimento fúngico (BERGEN; WAGNER-MERNER, 1977 apud SENNA-NUNES, 2000), pois é um ambiente rico em nutrientes. Estes fatores que favorecem o desenvolvimento fúngico foram observados nas partes das gaiolas compostas por madeira e no meio de desenvolvimento larval.

Esse problema foi corrigido com a substituição das gaiolas de madeira por gaiolas feitas de material plástico (Figura 1 e 2) e pelo armazenamento dos recipientes com a mistura, em sacos de polipropileno, permitindo-se assim, sua autoclavagem e conservação em refrigerador. A mistura destinada aos bioensaios de ovos e larvas foi armazenada em tubos de ensaio de vidro e fechados com rolha de algodão hidrófilo revestido com tecido fino, pois a primeira tentativa de exposição fúngica dos ovos e subsequente acondicionamento em Becker resultou em contaminação de todos recipientes. Após a adoção destas medidas, o meio de desenvolvimento larval foi utilizado nos bioensaio com menor risco de contaminação, e ainda, favoreceu o reisolamento do fungo *M. anisopliae* na fase de confirmação fúngica do experimento.

#### **4.1.7 Comportamento de *Stomoxys calcitrans* em laboratório**

As pupas ou as moscas recém-emergidas não devem ser colocadas em gaiolas onde existam moscas adultas, pois no momento em que as moscas saem do pupário, ainda não se apresentam totalmente enrijecidas e possuem movimento mais lento. Com isto, as moscas maduras, já existentes na gaiola, atacam as recém-emergidas.

As moscas mantidas na gaiola plástica apresentaram alteração em seu comportamento com relação às moscas mortas ou de movimento mais lento presentes no fundo da gaiola. Estas tentavam introduzir o aparelho bucal no abdome das moscas mortas até que fosse realizadas a penetração e sucção de seu conteúdo, mesmo com o sangue bovino citratado disponível para alimentação. Isto pode estar relacionado ao próprio instinto da mosca em introduzir seu aparelho bucal para se alimentar, ou ainda, pela própria competição existente no interior da gaiola.

A partir de exemplares de *S. calcitrans* capturados no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Mello (1989) realizou a adaptação das moscas em gaiola de madeira e tela de nylon (30 X 30X 30 cm). Esta gaiola foi mantida em estufa climatizada (27° C, 70 - 80% U.R.) para que houvesse uma adaptação mais rápida das moscas a nova condição. Com o mesmo intuito, o sangue citratado era pré-aquecido e fornecido em gaze acomodada em placa de Petri. Foi verificado pelo autor, que nestas condições houve dificuldade para que as moscas se alimentassem, resultando em um grande número de moscas mortas após 24 horas de realizada a captura. Ao final de três meses, foi obtida a primeira postura em cativeiro. Estes ovos desenvolveram e resultaram em adultos adaptados às condições laboratoriais, não necessitando de aquecimento prévio do sangue. No atual estudo, esta situação não foi observada, pois a postura se iniciou em torno do terceiro dia após captura. A recusa em se alimentar na almofada de sangue não foi tão evidente quanto observado pelo autor (MELLO, 1989). Realmente, algumas moscas relutaram em se alimentar, mas este comportamento não foi tão intenso. Quando verificado o desinteresse das moscas em se alimentar na gaze, a placa de Petri era passada por toda a gaiola para que as moscas constatassem a presença do sangue e fossem estimuladas pelo movimento. Com o tempo, foi verificado que as moscas se adaptaram e associaram o movimento no interior da gaiola à alimentação. O fornecimento de sangue foi realizado em torno das nove horas da manhã, onde foi observada maior atividade desta mosca (HERRERO et al., 1989).

No presente estudo, as moscas preferiram se alimentar na gaze embebida com sangue citratado, em formato de almofada no interior da gaiola, pois tentativas realizadas com simples deposição de gaze embebida de sangue em placa de Petri no interior da gaiola, como descrito por (MELLO, 1989) ou a gaze embebida sobre a tela de nylon na parte superior (MACEDO, 2001) ou na lateral (CHRISTMAS, 1970) não foram efetivas.

#### **4.2 Bioensaios**

O método de exposição de ovos e larvas foi adaptado à espécie estudada, tendo como base a metodologia descrita por Barson et al. (1994), Watson et al (1995) e Senna-Nunes et al. (2002), onde estes autores utilizaram larvas com 72 horas de emergidas. Entretanto, no presente estudo, esta metodologia não pôde ser utilizada, pois as larvas de *S. calcitrans* foram sensíveis à manipulação, resultando em alta mortalidade. Por esta razão os bioensaios foram realizados com ovos e larvas com nove dias de desenvolvimento.

Além disso, ocorreu alta mortalidade quando se utilizou placa de Petri contendo filtro de papel úmido, pois as larvas recém-emergidas saíam da placa a procura de um local para se esconder ou ressecavam no vidro da mesma. Por isso, a placa de Petri com algodão embebido em água destilada estéril foi utilizada para que fosse possível a observação da mortalidade de larvas não alimentadas provenientes de ovos expostos ao fungo. Também foi constatado, que as larvas que não tiveram acesso ao meio de desenvolvimento larval morreram ou se



apresentaram menores que as larvas que tiveram acesso, por isso foi utilizada esta mistura nos dois outros métodos de exposição dos ovos e no bioensaio de exposição de larvas com nove dias de desenvolvimento.

O método de gotejamento da suspensão fúngica utilizado no bioensaio de exposição de ovos, foi adaptado a partir de trabalhos realizados por Kaaya e Munyinyi (1995) e Watson et al. (1995), onde estes autores misturaram o fungo ao meio de desenvolvimento larval. A suspensão fúngica e sucessivas diluições foram adicionadas por gotejamento nos tubos de ensaio contendo o meio de desenvolvimento larval e ovos, para simular a aplicação de suspensões aquosas no campo. Deste modo, foi possível comparar se o método de exposição dos ovos às suspensões fúngicas afetou na inviabilidade destes, como detalhado mais a diante.

#### **4.2.1 Mortalidade dos controles**

Nos bioensaios com ovos, o percentual de mortalidade dos controles foi elevado. No caso do bioensaio em que os ovos foram depositados em placa de Petri contendo algodão hidrófilo estéril, as perdas foram tão elevadas, que impossibilitou a correção da mortalidade do controle pela fórmula de Abbott. A alta mortalidade de *S. calcitrans* para realização de bioensaios é um fato descrito pela maioria dos trabalhos científicos. Watson et al. (1995) destacam que o período larval é o mais crítico, pois as perdas são consideráveis. Além disso, em seu experimento, o grupo controle de moscas adultas alcançou  $35,67\% \pm 18,05\%$  de mortalidade após o sétimo dia de exposição ao fungo, o que influenciou na avaliação dos resultados. A dificuldade na realização de bioensaios, utilizando *S. calcitrans* em condições laboratoriais foi destacada por Skovgard e Steenberg (2002), pois a avaliação da atividade fúngica de *E. muscae* sobre a referida mosca não foi concluída, devido à alta mortalidade ocorrida, o que impossibilitou a análise dos dados.

A média da eclodibilidade dos ovos armazenados em algodão pertencentes aos grupos controle foi de apenas 16,02%, o que impossibilitou a comparação dos resultados com as outras duas metodologias de exposição fúngica. Enquanto que a média de eclodibilidade dos outros dois métodos, que utilizavam meio de desenvolvimento larval, foi de 51,98%. Estes resultados foram inferiores aos obtidos por Mello (1989), no qual obteve 79,61% de eclodibilidade dos ovos provenientes da colônia de *S. calcitrans*, onde foram avaliados alguns aspectos do desenvolvimento biológico e comportamento da mosca. Isso provavelmente resultou em menor manipulação destes ovos, quando comparado aos procedimentos de exposição dos ovos ao fungo do presente estudo. Além disso, a ausência de nutrientes no meio de eclosão dos ovos do primeiro bioensaio influenciou na viabilidade das larvas, pois estas necessitam matéria orgânica para se alimentar (URQUHART et al., 1996) e são dependentes deste meio para se protegerem da luz e do ressecamento (GUIMARÃES, 1983). Logo, estes percentuais mostram que não se deve realizar a avaliação da ação entomopatogênica de fungos sobre larvas não alimentadas de *S. calcitrans*.

#### **4.2.2 Infecção *in vitro* de ovos**

O método de exposição dos ovos as diferentes concentrações fúngicas por imersão e subsequente transferência para placas de Petri com algodão não ocasionou bons resultados para serem analisados (Tabela 1), devido à alta mortalidade ocorrida em todos os tratamentos, inclusive os grupos controles positivo e negativo.

A metodologia utilizada por Senna-Nunes et al. (2002), na qual larvas de mosca doméstica são expostas aos fungos, sendo estas mantidas em placa de Petri sem alimento, não deve ser adaptada para a exposição de ovos de *S. calcitrans*, pois mesmo que ocorra a eclosão da maioria dos ovos utilizados no experimento, as larvas recém-formadas não sobrevivem, ou são obtidas larvas menores que as larvas de mesma idade acomodadas em meio de desenvolvimento larval.

Como pode ser visto na Tabela 1, não houve diferença significativa entre os percentuais dos tratamentos utilizados e os controles, porém, houve diferença entre as suspensões fúngicas nas concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml. Mesmo sendo obtido maior percentual de inviabilidade dos ovos expostos a suspensão fúngica na concentração de  $10^8$  conídios/ml, esta não deve ser considerada a mais efetiva, pois este resultado foi similar ao obtido nos controles.

Nos métodos de exposição de ovos por imersão ou gotejamento das suspensões fúngicas e posterior transferência ao meio de desenvolvimento larval, a ocorrência da mortalidade de ambos os controles foi corrigida pela fórmula de Abbott. Os melhores resultados foram obtidos nos bioensaios de exposição de ovos e transferência para meio de desenvolvimento larval na concentração de  $2,3 \times 10^8$  conídios/ml (Tabela 2) e  $2,1 \times 10^8$  conídios/ml (Tabela 3), onde ocorreu 100% de inviabilidade dos ovos. O segundo melhor resultado foi verificado quando foi realizada a imersão dos ovos (Tabela 2) na concentração de  $10^7$  conídios/ml, onde foi alcançado 92,85% de inviabilidade. A inviabilidade de ovos expostos ao fungo *M. anisopliae* também foi verificada por Ángel-Saragún et al. (2005), onde estes autores constataram que algumas cepas fúngicas foram capazes de reduzir a emergência de adultos de *H. irritans*. Algumas suspensões de *M. anisopliae* reduziram a emergência de adultos provenientes de ovos expostos à concentração de  $10^6$  conídios/ml, obtendo-se 6,25%, 46,25%, 50,0 % e 63,75% de emergência. Pode-se verificar que resultado similar somente foi alcançado no presente estudo, quando foram utilizadas suspensões fúngicas mais concentradas, demonstrando com isso, maior resistência da mosca dos estábulos frente a atividade fúngica, quando comparada a outras espécies de moscas.

#### **4.2.3 Comparação entre metodologias de infecção *in vitro* de ovos**

Devido à alta mortalidade ocorrida em todos os grupos tratados e controles do primeiro bioensaio (Tabela 1), este método foi considerado inadequado para exposição de ovos de *S. calcitrans*, não sendo recomendada a sua utilização e por esta razão, não foi comparado estatisticamente com os métodos de imersão e de gotejamento (Tabela 4).

Quando se utilizou a concentração de  $10^8$  conídios/ml, verificou-se diferença significativa entre o grupo tratado por esta suspensão e o grupo controle, tanto no segundo quanto no terceiro bioensaio de exposição de ovos, entretanto não ocorreu diferença significativa entre as suspensões de  $10^8$  conídios/ml em ambas as metodologias (Tabela 4). Na concentração de  $10^7$  conídios/ml houve diferença significativa entre os grupos nos dois métodos de exposição. Estes resultados possivelmente estão relacionados ao maior contato dos ovos com a suspensão fúngica, quando utilizada a imersão no segundo método. Apesar do primeiro método ser mais efetivo nas duas maiores concentrações, o segundo método é o que mais se assemelha a aplicação de suspensão fúngica sobre o material orgânico, no qual a fêmea deposita os ovos em condições naturais.

Mesmo não sendo possível realizar a contagem de larvas recém-emergidas dos ovos expostos ao fungo nos dois métodos de exposição, foi visualizado na parte interior da superfície dos tubos de ensaio, na concentração de  $10^8$  conídios/ml, que algumas larvas foram afetadas pela atividade fúngica. Estas apresentaram incoordenação motora, aspecto liquefeito e proliferação fúngica em sua superfície. Neste estudo, foi observado que o fungo *M. anisopliae* é capaz de inviabilizar ovos de *S. calcitrans* e parece que sua ação parasitária pode se estender ao controle de larvas jovens, pois em trabalhos em que foram utilizadas larvas de *M. domestica* com 72 horas de vida, foram obtidos bons resultados. Logo, os resultados e observações realizadas no presente estudo, associados aos verificados em outros trabalhos (SENNA-NUNES et al., 2002; ÁNGEL-SAHAGÚN, 2005), sugerem que fungos entomopatogênicos possuem potencial para controlar larvas jovens, porém mais estudos serão

**Tabela 1.** Eclosão de ovos de *S. calcitrans*, expostos a diferentes concentrações da suspensão aquosa de *M. anisopliae*, pelo método de imersão e transferência para algodão em placa de Petri:

Tratamentos (conídios/ml)	Ovos Expostos	Eclosão (%)	Resultados Absolutos		Desvio Padrão (%)	*
			Inviabilidade (%)			
Controle -	78	16,67	83,33		8,0	ab
Controle +	78	15,38	84,62		8,0	ab
10 <sup>5</sup>	78	12,82	87,18		7,0	ab
10 <sup>6</sup>	78	19,23	80,77		8,0	ab
10 <sup>7</sup>	78	25,64	74,36		9,0	b
10 <sup>8</sup>	78	10,26	89,74		6,0	a

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

**Tabela 2.** Eclosão de ovos de *S. calcitrans*, expostos a diferentes concentrações da suspensão aquosa de *M. anisopliae*, pelo método de imersão e transferência para o meio de desenvolvimento larval:

Tratamentos (conídios/ml)	Ovos Expostos	Resultados Absolutos		Resultados Corrigidos (Abbott)			*
		Eclosão (%)	Inviabilidade (%)	Eclosão (%)	Inviabilidade (%)	Desvio Padrão (%)	
Controle -	80	52,50	47,50	52,50	47,50	10,0	c
Controle +	80	58,75	41,25	-	-	-	c
10 <sup>5</sup>	80	30,00	70,00	57,50	42,50	10,0	c
10 <sup>6</sup>	80	32,50	67,50	62,50	37,50	10,0	c
10 <sup>7</sup>	80	3,75	96,25	7,50	92,50	5,0	b
10 <sup>8</sup>	80	0	100,00	0	100,00	0	a

\*Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

**Tabela 3.** Eclosão de ovos de *S. calcitrans*, expostos a diferentes concentrações da suspensão aquosa de *M. anisopliae*, pelo método de gotejamento da suspensão sobre os ovos em meio de desenvolvimento larval:

Tratamentos (conídios/ml)	Ovos Expostos	Resultados Absolutos		Resultados Corrigidos (Abbott)			*
		Eclosão (%)	Inviabilidade (%)	Eclosão (%)	Inviabilidade (%)	Desvio Padrão (%)	
Controle -	120	46,67	53,33	46,67	53,33	8,0	b
Controle +	120	50,00	50,00	-	-	-	b
10 <sup>5</sup>	120	23,33	76,67	50,00	50,00	8,0	b
10 <sup>6</sup>	120	28,33	71,67	60,00	40,00	8,0	b
10 <sup>7</sup>	120	21,67	78,33	46,67	53,33	8,0	b
10 <sup>8</sup>	120	0	100,00	0	100,00	0	a

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

**Tabela 4.** Comparação entre a eclosão de ovos, expostos às altas concentrações das suspensões aquosas de *M. anisopliae*, pelos segundo e terceiro métodos:

Tratamentos (conídios/ml)	Ovos Expostos	Resultados Corrigidos (Abbott)		*
		Inviabilidade (%)	Desvio Padrão (%)	
<u>Segundo Método</u>				
10 <sup>7</sup>	80	92,5	5,0	b
10 <sup>8</sup>	80	100,0	0	a
<u>Terceiro Método</u>				
10 <sup>7</sup>	120	53,33	8,0	c
10 <sup>8</sup>	120	100,0	0	a

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

necessários para confirmar tal afirmação.

#### 4.2.4 Infecção *in vitro* de larvas

Como pode ser observado na Tabela 5, não houve diferença significativa entre a mortalidade de larvas expostas às suspensões fúngicas e os controles, pois a maioria das larvas realizou a pupação. Senna-Nunes et al. (2002) também observaram que larvas de *M. domestica* expostas a *A. flavus* e *P. corylophilum*, não foram afetadas durante o período pupal. Com relação ao percentual de sobrevivência larval, não houve diferença estatística entre os tratamentos que utilizaram as suspensões aquosas do primeiro fungo, enquanto que nos tratamentos que utilizaram suspensões do segundo fungo, ocorreu maior mortalidade na concentração de  $10^8$  conídios/ml, ou seja, 36,25% e 27,50% nas cepas estudadas. Com relação à resistência de larvas aos fungos, resultado similar foi verificado por Bernal et al. (2003), pois suspensões de *M. anisopliae* utilizadas nas concentrações de  $1 \times 10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  não foram capazes de afetar larvas de segundo instar de *S. calcitrans*. Os resultados obtidos por ambos os autores estão de acordo com o encontrado no presente estudo, pois não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, apenas sendo observada mortalidade larval de até 37,70% na concentração de  $10^6$  conídios/ml (Tabela 5). Em contrapartida, Watson et al. (1995) verificaram que larvas de *M. domestica* adicionadas ao meio de desenvolvimento larval contendo cepas P89 e L90 de *B. bassiana*, na concentração de  $1 \times 10^{10}$  conídios/cm<sup>2</sup>, foram capazes de inviabilizar 48% e 56% das larvas, respectivamente. Como pode ser observado, existe uma variação significativa com relação à cepa fúngica, formulação e dose utilizada, pois há diferença entre a susceptibilidade destas duas espécies de moscas aos microorganismos entomopatogênicos utilizados.

Foi observado que o fungo utilizado no presente estudo não foi capaz de afetar a emergência de moscas provenientes de larvas expostas às suspensões fúngicas (Tabela 6 e 7). Mesmo havendo maior período de contato entre o fungo e os indivíduos expostos, este não foi o suficiente para que houvesse interferência estatisticamente significativa na mortalidade das pupas. Por outro lado, trabalho realizado por Senna-Nunes et al. (2002) revelou que o percentual de emergência das moscas foi inversamente proporcional à concentração das suspensões utilizadas em larvas de *M. domestica*. E ainda, Barson et al. (1994) verificaram que dentre as diferentes espécies fúngicas utilizadas, *M. anisopliae* afetou em 100% da emergência de moscas domésticas quando expostas às concentrações de  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^7$  conídios/ml e 99% na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/ml. Enquanto que o fungo *T. cylindrosporum* foi capaz de afetar 100% de emergência das moscas expostas às concentrações de  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios/ml. Quando os percentuais de emergência, obtidos nas mais altas concentrações do presente estudo (Tabela 6 e 7), são comparados com os resultados verificados por estes autores, pode-se constatar que a mosca doméstica apresenta maior susceptibilidade aos fungos quando comparada a mosca dos estábulos. A diferença pode ainda estar relacionada à utilização de larvas com 72 horas de vida em ambos os estudos (BARSON et al., 1994; SENNA-NUNES et al., 2002). A tentativa de exposição de larvas de *S. calcitrans* com a mesma idade da descrita por estes autores não foi concluída, devido à elevada mortalidade ocorrida em todos os grupos no momento de realização do bioensaio, incluindo os controles. Por esta razão, foram utilizadas larvas com nove dias de vida, o que pode ter colaborado para a maior resistência das larvas expostas as diferentes concentrações fúngicas de *M. anisopliae*, diferindo assim do descrito pelos autores citados acima.

Kaaya e Munyinyi (1995) verificaram que a mortalidade de pupas variou de 2 a 8% quando estas foram provenientes de larvas expostas aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* misturadas a areia. Porém, foi observada alta mortalidade nas moscas Tsetsé recém-emergidas provenientes destas pupas, ou seja, 80% e 97% de mortalidade na concentração de 1g/l, respectivamente. Mesmo tendo sido aplicada outra metodologia de exposição de larvas ao

**Tabela 5.** Mortalidade de larvas de *S. calcitrans*, expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *M. anisopliae*, pelo método de imersão e transferência ao meio de desenvolvimento larval:

Tratamentos (conídios/ml)	Larvas Expostas	Pupação (%)	Mortalidade (%)	Desvio Padrão (%)	*
Controle -	61	78,69	21,31	10,0	a
Controle +	61	81,97	18,03	9,0	a
10 <sup>5</sup>	61	70,49	29,51	11,0	a
10 <sup>6</sup>	61	62,30	37,70	12,0	a
10 <sup>7</sup>	61	73,77	26,23	11,0	a
10 <sup>8</sup>	61	67,21	32,79	11,0	a

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

**Tabela 6.** Mortalidade de moscas de *S. calcitrans*, provenientes de larvas expostas a diferentes concentrações da suspensão aquosa de *M. anisopliae*:

Tratamentos (conídios/ml)	Larvas Expostas	Emergência (%)	Mortalidade (%)	Desvio Padrão (%)	*
Controle -	61	72,13	27,87	11,0	a
Controle +	61	65,57	34,43	11,0	a
10 <sup>5</sup>	61	60,65	39,34	12,0	a
10 <sup>6</sup>	61	55,74	44,26	12,0	a
10 <sup>7</sup>	61	65,57	34,43	11,0	a
10 <sup>8</sup>	61	49,18	45,90	12,0	a

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

fungo, foi constatado que a espécie fúngica utilizada no presente estudo não foi capaz de inviabilizar significativamente a pupação (Tabela 7) e nem a emergência das moscas provenientes destas pupas (Tabela 6), pois não houve diferença entre os tratamentos e os controles, diferindo assim do relatado por Kaaya e Munyinyi (1995). A resistência de *S. calcitrans* ao fungo *M. anisopliae*, pode estar relacionada ao ambiente onde suas larvas se desenvolvem, pois em condições naturais, a existência de uma diversidade de microorganismos estimularia a resistência em fases mais avançadas do desenvolvimento larval.

Lecuona et al. (2005) avaliaram a patogenicidade de cepas fúngicas na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml sobre larvas de terceiro instar (72 horas de eclodidas) de mosca doméstica. Cinco de nove cepas de *B. bassiana* resultaram em maior mortalidade quando comparadas ao controle (Bb72, Bb10, Bb6, Bb96 e Bb4), onde foi monitorada a emergência de adultos por até duas semanas. Após avaliação da mortalidade das moscas expostas às cepas produzidas em resíduos de arroz, os autores concluíram que dentre todas as cepas utilizadas, a Bb72 foi mais virulenta (97% de mortalidade) e efetiva produtora de conídios, indicando que esta é a mais promissora no futuro desenvolvimento de micoinseticidas para *M. domestica*. Isso demonstra que moscas adultas podem ser susceptíveis ao parasitismo realizado pelos fungos, quando estes são utilizados em elevadas concentrações e que há a possibilidade de sua aplicação no meio de desenvolvimento dos estágios imaturos.

#### **4.2.5 Comparação do efeito da exposição *in vitro* de ovos e larvas**

Comparando-se as duas maiores concentrações fúngicas utilizadas nos bioensaios de exposição de ovos e larvas por imersão (Tabela 8), verificou-se que quanto mais concentrada a suspensão fúngica de *M. anisopliae* e quanto mais precoce o estágio de vida da mosca, maior percentual de mortalidade é alcançado, pois foi observado que as suspensões utilizadas nas larvas, não causaram efeito tão expressivo quanto verificado nos ovos, ou seja, inviabilidade em 100% dos ovos na concentração de  $10^8$  conídios/ml e 92,5% na concentração de  $10^7$  conídios/ml.

Esses resultados podem estar relacionados à maior resistência adquirida pelas larvas à ação de enzimas produzidas pelos esporos de *M. anisopliae* (ST. LEGER et al, 1991). Além disto, Watson et al. (1995) destacam que o próprio ambiente contaminado onde as larvas se desenvolvem, poderia estimular a defesa imunológica destas. Os resultados do presente estudo sugerem que as larvas, no decorrer de seu desenvolvimento, podem não ser afetadas pela ação do fungo, a ponto de não ocorrer mortalidade elevada. Entretanto, os fatores para a ocorrência desta resistência ainda precisam ser esclarecidos. Por esta razão, há a necessidade de se avaliar em laboratório e a campo as espécies fúngicas potencialmente patogênicas aos diferentes estágios do ciclo de vida de *S. calcitrans*

#### **4.2.6 Infecção *in vitro* de pupas**

No bioensaio de exposição de pupas, foi constatado que não houve diferença significativa entre os tratamentos e os controles (Tabela 9). A baixa mortalidade das pupas de *S. calcitrans* também foi observada no bioensaio com larvas (Tabela 7), pois a maioria das pupas provenientes das larvas expostas as diferentes concentrações fúngicas não se tornaram inviáveis. Os resultados obtidos nestes dois bioensaios sugerem que não há influência do maior tempo de contato do fungo a partir da exposição de larvas com nove dias de desenvolvimento até emergência dos adultos.

**Tabela 7.** Inviabilidade de pupas provenientes de larvas de *S. calcitrans* imersas em diferentes concentrações da suspensão aquosa de *M. anisopliae*:

Tratamentos (conídios/ml)	Pupas Recuperadas	Emergência (%)	Inviabilidade (%)	Desvio Padrão (%)	*
Controle -	48	91,67	8,33	7,0	a
Controle +	50	80,0	20,0	11,0	a
10 <sup>5</sup>	43	86,05	13,95	10,0	a
10 <sup>6</sup>	38	89,47	10,53	9,0	a
10 <sup>7</sup>	45	88,89	11,11	9,0	a
10 <sup>8</sup>	41	80,49	19,51	8,0	a

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

**Tabela 8.** Comparação entre a inviabilidade de ovos e larvas de *S. calcitrans*, expostos às elevadas concentrações das suspensões fúngicas de *M. anisopliae*, pelo método de imersão e transferência ao meio de desenvolvimento larval:

Estágio de aplicação da Suspensão Fúngica (conídios/ml)	Indivíduos Expostos	Inviabilidade (%)	Desvio Padrão (%)	*
<u>Ovo</u>				
10 <sup>8</sup>	80	100,0	0	a
10 <sup>7</sup>	80	92,5	5,0	b
<u>Larva (terceiro instar)</u>				
10 <sup>8</sup>	61	32,79	11,0	c
10 <sup>7</sup>	61	26,23	11,0	c

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)



Kaaya e Okech (1990b), verificaram a mortalidade de 90% e 100% dos adultos de *G. morsitans morsitans* em até 14 dias pós-exposição à suspensões de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Ao avaliar as pupas oriundas das moscas expostas a estes fungos, estes autores verificaram baixa mortalidade, porém significativa, quando esta foi comparada ao grupo controle. Mesmo não se tratando da espécie de mosca utilizada no presente estudo, também foi verificado por estes autores, que a emergência da mosca Tsetse não foi afetada quando larvas e pupas foram expostas aos fungos, apenas foi observada menor longevidade das moscas provenientes de larvas e pupas expostas a *B. bassiana*. Estes resultados mostram de dependendo da espécie de mosca utilizada e do estágio de vida ao qual se encontra, pode-se verificar maior ou menor susceptibilidade ao parasitismo fúngico.

Diferentemente do que foi encontrado no presente estudo, Ángel-Saragún (2005) verificaram 71,25% de inviabilidade de pupas de *H. irritans* expostas à suspensão fúngica de *M. anisopliae*, na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml. Entretanto, outras cepas da mesma espécie afetaram menos de 10% das pupas expostas à mesma concentração. No presente estudo, resultado semelhante foi alcançado apenas na concentração de  $2,3 \times 10^6$  conídios/ml (Tabela 9). Kaaya (1989) também verificou que larvas de *G. morsitans morsitans* expostas aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* não são afetadas, pois estes fungos não foram capazes de aumentar a inviabilidade de pupas. Os resultados obtidos nos dois bioensaios, onde foi avaliada a inviabilidade pupal ocasionada por *M. anisopliae* (Tabela 10), associada aos resultados obtidos pelos autores relatados acima, sugerem que as larvas em fase mais avançada de desenvolvimento e as pupas não são eficazmente afetadas pela ação parasitária deste fungo. Isto pode estar relacionado à resistência adquirida pela larva e pela capacidade protetora do pupário, o que permite o desenvolvimento da mosca em seu interior e posterior emergência.

#### **4.2.7 Comparação da mortalidade de ovos, larvas e pupas**

Ao avaliar os percentuais de inviabilidade de ovos, larvas e pupas de *S. calcitrans* expostos às maiores concentrações fúngicas, foi constatado que o maior percentual de mortalidade foi alcançado nas duas formas de exposição dos ovos ao fungo (Tabela 11 e 12). Os resultados obtidos com a exposição dos ovos diferiram estatisticamente dos resultados verificados a partir da exposição de larvas e pupas. Porém não ocorreu diferença significativa na mortalidade de larvas e pupas expostas a concentração de  $10^8$ , assim como na concentração de  $10^7$  conídios/ml. Deste modo, pode-se verificar que as suspensões conidiais de *M. anisopliae*, em altas concentrações, são capazes de afetar de maneira efetiva ovos de moscas dos estábulos em condições laboratoriais.

Na avaliação da susceptibilidade de ovos, pupas e adultos de *H. irritans*, Ángel-Saragún et al. (2005) constataram que os isolados de *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus* e *B. bassiana* foram patogênicos na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml aos adultos, onde o primeiro fungo ocasionou até 100% de mortalidade e o segundo 75% de mortalidade. Isolados de *M. anisopliae* causaram mortalidade máxima de 71,25% das pupas, enquanto que os outros isolados da mesma espécie afetaram menos de 10% destas. Por outro lado, houve uma cepa de *B. bassiana* que não foi patogênica ou infectou apenas 47% das pupas. E ainda, cepas de *P. fumosoroseus* causaram 50%, 41,25% e 23,25% de mortalidade. A emergência de adultos da mosca do chifre foi reduzida quando estas foram expostas à concentração fúngica de  $1 \times 10^6$  conídios/ml no estágio de ovo. Os resultados foram variáveis para as diferentes cepas de *M. anisopliae* utilizadas neste estudo (6,25%, 46,25%, 50% e 63,75%). Já para *B. bassiana* houve 11,25% e 43,75% de emergência, enquanto que, as cepas mais eficientes de *P. fumosoroseus* apresentaram emergência de 3,75%, 20% e 27,5% e as

**Tabela 9.** Inviabilidade de pupas de *S. calcitrans*, expostas as diferentes concentrações da suspensão aquosa de *M. anisopliae*, pelo método de imersão e transferência para placa de Petri:

Tratamentos (conídios/ml)	Pupas Expostas	Emergência (%)	Inviabilidade (%)	Desvio Padrão (%)	*
Controle -	30	70,0	30,0	16,0	a
Controle +	30	90,0	10,0	10,0	a
10 <sup>5</sup>	30	73,33	26,67	15,0	a
10 <sup>6</sup>	30	83,33	16,67	13,0	a
10 <sup>7</sup>	30	73,33	26,67	15,0	a
10 <sup>8</sup>	30	66,67	33,33	16,0	a

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

**Tabela 10.** Comparação entre a inviabilidade de pupas, provenientes de larvas imersas em diferentes concentrações da suspensão aquosa de *M. anisopliae* e de pupas expostas ao mesmo método:

Estágio de Exposição à Suspensão Fúngica (conídios/ml)	Pupas Avaliadas	Inviabilidade (%)	Desvio Padrão (%)	*
<u>Larva (terceiro instar)</u>				
10 <sup>5</sup>	43	13,95	10,0	a
10 <sup>6</sup>	38	10,53	9,0	a
10 <sup>7</sup>	45	11,11	9,0	a
10 <sup>8</sup>	41	19,51	8,0	a
<u>Pupas</u>				
10 <sup>5</sup>	30	26,67	15,0	a
10 <sup>6</sup>	30	16,67	13,0	a
10 <sup>7</sup>	30	26,27	15,0	a
10 <sup>8</sup>	30	33,33	16,0	a

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

**Tabela 11.** Comparação entre a mortalidade dos estágios imaturos de *S. calcitrans*, expostos às suspensões aquosas de *M. anisopliae* na concentração de  $10^8$  conídios/ml:

Estágio de Exposição à Suspensão Fúngica ( $10^8$ conídios/ml)	Indivíduos Expostos	Mortalidade (%)	Desvio Padrão da Mortalidade (%)	*
Ovos (Imersão)	80	100,0	0	a
Ovos (Gotejamento)	120	100,0	0	a
Larvas (Imersão)	61	32,79	11,0	b
Pupas (Imersão)	30	33,33	16,0	b

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

**Tabela 12.** Comparação entre a mortalidade dos estágios imaturos de *S. calcitrans*, expostos às suspensões aquosas de *M. anisopliae*, na concentração de  $10^7$  conídios/ml:

Estágio de Exposição à Suspensão Fúngica ( $10^7$ conídios/ml)	Indivíduos Expostos	Mortalidade (%)	Desvio Padrão da Mortalidade (%)	*
Ovos (Imersão)	80	92,5	5,0	a
Ovos (Gotejamento)	120	53,33	8,0	b
Larvas (Imersão)	61	26,23	11,0	c
Pupas (Imersão)	30	26,67	15,0	c

\* Mesma letra = Não há diferença significativa entre os tratamentos.

\*(p=0,05)

menos eficientes apresentaram 51,25%, 55% e 68,75% de emergência (ÁNGEL-SARAGÚN et al., 2005). Comparando-se os resultados do presente estudo com o descrito acima, pode-se constatar que mesmo apresentando comportamento alimentar semelhante, tanto *S. calcitrans* como *H. irritans* apresentam resposta diferenciada as espécies e cepas fúngicas, pois foi observado no atual estudo que o fungo utilizado somente foi efetivo no controle de ovos de *S. calcitrans*, enquanto que no estudo realizado por Ángel-Saragún et al. (2005) os fungos utilizados foram mais efetivos no controle de moscas adultas de *H. irritans*.

Os resultados do presente estudo indicam que a mosca dos estábulos apresenta maior resistência à ação fúngica quando comparada a estudos já realizados com outras moscas. Outros estudos devem ser realizados para avaliar a aplicabilidade do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* nos locais de desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca, devido à constatação em laboratório da susceptibilidade ocorrida apenas em ovos. A aplicação fúngica no ambiente também foi destacada por Kaaya e Munyinyi (1995) que buscavam verificar a aplicabilidade da utilização de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no meio de desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca Tsetse.

### **4.3 Comportamento Fúngico sobre Estágios Imaturos de *Stomoxys calcitrans***

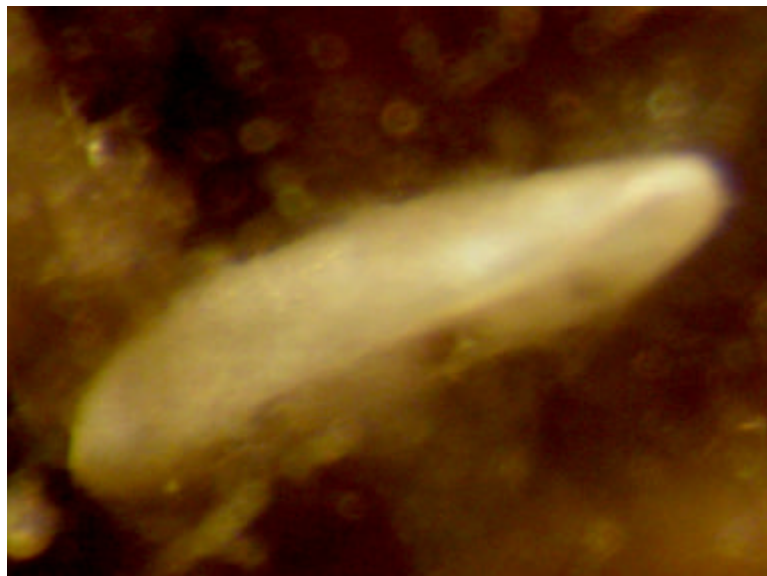
#### **4.3.1 Infecção *in vitro* de ovos**

O primeiro método de exposição dos ovos, onde não foi utilizado o meio de desenvolvimento larval, não proporcionou uma boa observação do crescimento fúngico, quando comparado aos outros métodos de exposição de ovos. Já nos dois métodos de exposição que utilizam este meio, foi possível visualizar o crescimento do fungo em todos os tubos de ensaio. A intensidade deste crescimento foi proporcional ao aumento da concentração fúngica utilizada, onde foi visualizado nos primeiros dias após exposição, um crescimento de hifas finas com aspecto algodinoso. Quatro dias anteriores à leitura, já era possível visualizar um crescimento fúngico verde.

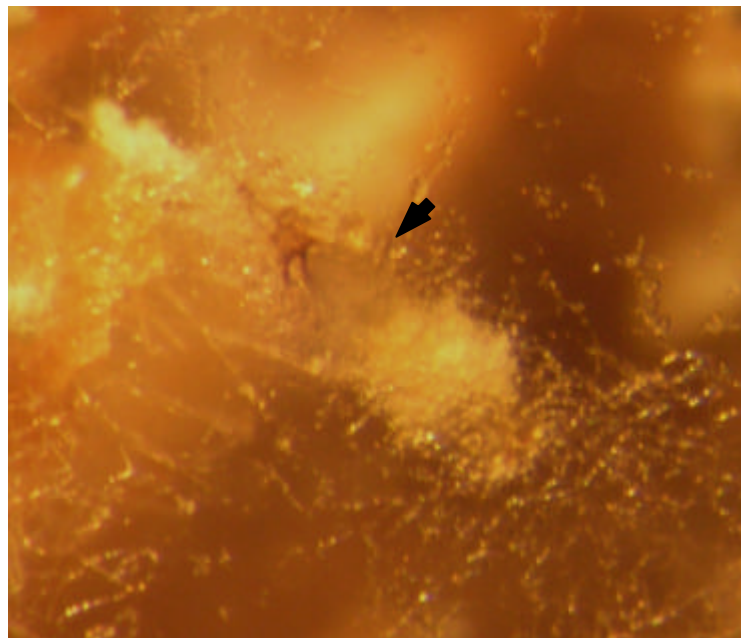
No dia da exposição fúngica, os ovos apresentavam uma coloração perolada brilhante. Após exposição, em torno do quinto dia, estes se tornaram opacos e com crescimento de hifas finas brancas (Figura 5). Próximo ao décimo dia, estes se apresentavam levemente esverdeados, principalmente nas duas maiores concentrações. Além disso, foi possível visualizar algumas larvas pequenas, provenientes dos ovos expostos ao fungo na concentração de  $10^8$  e  $10^7$  conídios/ml, que inicialmente apresentavam-se brilhosas e com seus órgãos internos visíveis. No mesmo período de observação dos ovos, foi constatado que estas larvas tornaram-se mais opacas. Posteriormente, adquiriram um aspecto liquefeito e mais transparente (Figura 6). Nesse momento, o crescimento de hifas era facilmente visualizado com auxílio de microscópio estereoscópico. O aspecto adquirido pelos ovos expostos e por algumas larvas jovens observadas nestes bioensaios pode estar relacionado ao efeito direto de enzimas produzidas pelo fungo, pois proteases e esterases produzidas por *M. anisopliae*, são capazes de degradar a cutícula dos insetos durante os eventos de penetração e de obtenção de nutrientes para seu desenvolvimento (ST. LEGER et al., (1991).

Nos tubos de ensaio utilizados nos bioensaios de exposição de ovos por gotejamento, na concentração de  $10^7$  conídios/ml, foi possível observar larvas maiores e de coloração creme, assim como túneis feitos pelas mesmas, enquanto que na concentração de  $10^8$  conídios/ml nenhuma larva deste porte foi observada em ambos os métodos de exposição que utilizaram o meio de desenvolvimento larval.

No segundo método de exposição dos ovos, foi constatado que uma larva pequena apresentava seus órgãos internos e cutícula com coloração esverdeada, e ainda, seu corpo não se apresentava tão transparente, adquirindo uma coloração creme no sétimo dia após ter sido



**Figura 5.** Crescimento de hifas de *M. anisopliae* e presença de conídios sobre ovo de *S. calcitrans* exposto a suspensão fúngica na concentração de  $2,3 \times 10^8$  conídio/ml pelo método de imersão e transferência ao meio de desenvolvimento larval.



**Figura 6.** Larva de *S. calcitrans* com aspecto liquefeito e presença de hifas de *M. anisopliae*, proveniente da exposição de ovos a suspensão fúngica na concentração de  $2,1 \times 10^8$  conídios/ml pelo método de gotejamento.

realizada a exposição ao fungo. Quando o tubo de ensaio foi posicionado no microscópio estereoscópico, de tal forma que a luz ficasse sobre a larva, esta apresentou movimentos mais letárgicos na metade anterior do corpo, e a porção posterior restante apresentava-se paralisada. Como descrito neste evento, Alves (1998) relata que após a ocorrência da interação entre fungo e o hospedeiro, o inseto apresenta movimentos vagarosos, paralisia, perda da coordenação dos movimentos e desorientação. Este autor ainda relata que estes distúrbios nervosos são observados nos últimos estágios da doença. Isso mostra que a larva em questão, mesmo não tendo sido imersa no momento da exposição, apresentou uma sintomatologia que indica a ação parasitária de *M. anisopliae*, sugerindo que larvas jovens poderiam ser afetadas, desde que permaneçam em local onde exista uma boa proliferação fúngica.

#### 4.3.2 Infecção *in vitro* de larvas e pupas

Após exposição das larvas ao fungo, estas foram transferidas aos tubos de ensaio contendo o meio de desenvolvimento larval, onde no dia seguinte ao experimento, os túneis realizados pelas larvas já eram visíveis. O crescimento fúngico também foi observado em todo comprimento do tubo onde havia o meio, tornando-se mais intenso, conforme o aumento da concentração fúngica. Mesmo não ocorrendo diferença significativa entre os tratamentos, as larvas que morreram nas concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml desmancharam ou mumificaram. No primeiro caso, só era possível visualizar os ganchos cefálicos, enquanto que no segundo, as larvas apresentavam sua superfície externa enrijecida e o seu interior liquefeito. Estas ainda apresentavam uma coloração creme, onde seus órgãos internos não eram mais visualizados. A coloração creme e o aspecto liquefeito observado estão relacionados ao parasitismo realizado pelo fungo, pois após penetração, o interior de inseto é colonizado e seu organismo é utilizado como fonte de nutrientes para o desenvolvimento do fungo. Por esta razão, ocorrem modificações no aspecto do inseto, o tornando rijo e mumificado (ALVES, 1998).

Após o quinto dia da realização do experimento, foi possível visualizar em microscópio estereoscópico, o crescimento de hifas finas brancas nessas larvas, primeiramente nos segmentos, porção final do corpo e no aparelho bucal. Neste momento, não havia crescimento hifal visível nas placas estigmáticas, somente era observado hifas saindo pelos sulcos do próprio tegumento (Figura 7). Em seguida, iniciava-se um crescimento pulverulento verde sobre os mesmos locais. Somente próximo ao dia de leitura dos tubos, o crescimento fúngico se expandiu sobre todos os segmentos (Figura 8). Também já era visível o crescimento do fungo no último segmento do corpo onde estão localizadas as placas estigmáticas. Apesar de Steinkraus et al. (1990) terem realizado seu estudo com adultos de *M. domestica*, estes verificaram a emergência de micélio branco de *B. bassiana* na probóscide, pescoço, base da asa e articulações das pernas e após 48 horas os cadáveres apresentavam-se totalmente cobertos com um fino micélio branco. A completa esporulação ocorreu dentro de quatro dias *post-mortem*. Estes resultados mostram que os fungos entomopatogênicos emergem principalmente entre os segmentos do tegumento, ou seja, nos locais mais tênues da cutícula, como observado no presente estudo e relatado pelos autores (STEINKRAUS et al., 1990).

As larvas viáveis após exposição às suspensões fúngicas realizaram a pupação. Mesmo não havendo diferença significativa com os controles, somente nas duas maiores concentrações fúngicas foram observadas a má formação de pupas (Figura 9). Algumas larvas mantiveram seu aspecto, mas adquiriram a coloração e textura de pupa. Em outras, a metade do corpo se tornou pupa e outra metade mudou somente a coloração para castanha escura. E ainda, algumas pupas que se formaram, aparentemente normais, resultaram em moscas que não conseguiram sair completamente do pupário.

Apesar de não ter sido notada num primeiro momento a ação do fungo sobre as pupas, após contagem das moscas formadas, as pupas inviáveis foram depositadas em câmara úmida, o que favoreceu o crescimento de hifas brancas e posterior proliferação pulverulenta verde em toda superfície do pupário. Steinkraus et al. (1990) obtiveram o desenvolvimento de micélio de *B. bassiana* sobre as pupas após 18 a 27 dias de realizada a exposição das larvas de *M. domestica*. Os resultados do presente estudo diferiram do relatado por estes autores, pois o crescimento completo de *M. anisopliae* sobre as pupas foi verificado após 10 dias de realizada a transferência da pupa inviável à câmara úmida.

Estas observações sugerem que o fungo *M. anisopliae* penetra pela cutícula, liquefaz os órgãos internos e exterioriza suas hifas primariamente nos locais mais delgados na superfície de larvas e pupas de *S. calcitrans*. Estes eventos de infecção e proliferação fúngica sobre estágios imaturos da mosca foram semelhantes aos descritos por St. Leger et al. (1991) e Alves (1998), onde é relatado que o crescimento fúngico e a conidiogênese sobre a cutícula dos indivíduos expostos iniciou-se principalmente nos locais mais frágeis da superfície do inseto.

No presente estudo foi verificado que *M. anisopliae* é capaz de infectar e causar doença nos estágios imaturos da mosca dos estábulos, principalmente em ovos, pois larvas maduras e pupas foram pouco afetadas. O fungo *M. anisopliae* possui potencial para o controle de *S. calcitrans*, desde que seja utilizado nos locais de oviposição da mosca dos estábulos.



**Figura 7.** Larva de *S. calcitrans*, apresentando coloração creme, aspecto enrijecido e com presença de hifas de *M. anisopliae*, resultante da imersão em suspensão fúngica na concentração de  $2,1 \times 10^8$  conídios/ml.



**Figura 8.** Larva de *S. calcitrans*, apresentando coloração creme, aspecto enrijecido e com presença de hifas e conídios de *M. anisopliae*, exposta por imersão em suspensão fúngica na concentração de  $2,1 \times 10^8$  conídios/ml.



**Figura 9.** Pupa de *S. calcitrans* apresentando má formação, proveniente da exposição de larvas por imersão na concentração de  $2,1 \times 10^8$  conídios/ml.



## 5 CONCLUSÕES

Após avaliação do experimento em condições controladas de laboratório e exposição de seus de ovos, larvas e pupas às suspensões aquosas de *M. anisopliae*, pode-se concluir que:

1. A criação de moscas dos estábulos, em condições laboratoriais, deve ser adequada ao comportamento da mosca, assim como para a realização de bioensaios de controle microbiano, visando o bem-estar da população de moscas em ambiente controlado e a redução de contaminantes fúngicos.
2. A exposição de ovos por imersão em suspensão fúngica e transferência para o meio de desenvolvimento larval foi o método mais efetivo.
3. A ação entomopatogênica de *M. anisopliae* sobre ovos e larvas de *S. calcitrans* não deve ser avaliada quando não é fornecido o meio para desenvolvimento larval
4. *Metarhizium anisopliae* inviabiliza significativamente ovos de *S. calcitrans* quando estes são expostos a altas concentrações fúngicas e não causa mortalidade significativa em larvas e pupas.
5. O fungo *M. anisopliae* causa alterações patológicas nos estágios imaturos da mosca dos estábulos.
6. *Metarhizium anisopliae* apresenta potencial para atuar como agente no controle biológico de *S. calcitrans*, desde que os ovos desta mosca sejam expostos à ação fúngica.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRRES, R.; GALINDO-VELASCO, E.; MOLINA-OCHOA, J.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; DOMINGUEZ-REBOLLEDO, O.; CRUZ-VÁRQUEZ, C.; REVES-VELÁZQUEZ, W. P. Avances en el control biológico de *Haematobia irritans* con hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (hyphomycetes). Disponível em: <<http://www.microbiologia.org.mx/CONAMI/Resumeness-Trabajos-Libres/angel-Sahagun.doc>>. Acesso em: 28 març. 2005.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed., São Paulo: FEALQ, 1998, 1163 p.

ALMEIDA, B. M.; PIRES, S. D.; AZEVEDO, F. D.; BADINI, P. V.; MORAES, A. P. R., JULIASSE, M. A.; BITTENCOURT, A. J. Predileção de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) por diferentes pelagens de bovinos em municípios do RJ. In: XI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2001. Seropédica. Anais... Seropédica: Editora da Universidade Rural, 2001. v. 11, n. 1, p. 197-198.

BADINI, P. B.; MORAES, A. P. R.; SILVA, R. T.; BITTENCOURT, A. J. Parasitismo por *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) associado a diferentes regiões do corpo e pelagem de vacas leiteiras do município de Resende – RJ. In: XIII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2003. Seropédica. Anais... Seropédica: Editora da Universidade Rural, 2003. v. 13, n. 1, p. 335-338.

BADINI, P. V.; MORAES, A. P. R. CASTRO, B. G.; ALMEIDA, C. R. R.; SOUZA, M. M. S.; BITTENCOURT, A. J. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites no município de Rio Claro – RJ. In: XIV JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2004. Seropédica. Anais... Seropédica: Editora da Universidade Rural, 2004. v.14, n. 1, p. 443-448.

BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A. F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the House Fly (*Musca domestica*, L.), a pest of intensive animal units. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 64, p. 107-134, 1994.

BAYLEY, D. L.; WHITEFIELD, T. L.; SMITTLE, B. J. Flight and dispersal of the stable fly. *Journal of Economic Entomology*, v. 66, n. 2, p. 410-411, 1973.

BENIGNO, R. N. M. Classificação etária, fisiológica e comportamento alimentar de acordo com o sexo e desenvolvimento ovariano em *Stomoxys calcitrans* (L.) (DIPTERA-MUSCIDAE). 1987. 96p. Tese (Mestrado em Ciências em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1987.

BERGEN, L.; WAGNER-MERNER, D. T. Comparative survey of fungi and potential pathogenic fungi from selected beaches in the Tampa bay area. *Mycologia*, v. 69, p. 299-308, 1977 apud SENNA-NUNES, M. S. Isolamento, identificação e avaliação da patogenicidade *in vitro* de fungos em *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Díptera: Muscidae), capturadas em dois

criadouros no município de Seropédica. 2000. 79f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

BERNAL, E. J.; ARCILA, V. H.; SERRANO-NOVOA, C. A. Control biológico de la mosca del estábulo *Stomoxys calcitrans* com el hongo entomopatogeno *Metarhizium anisopliae*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuaria*, v. 16, p. 54, 2003, Suplemento.

BITTENCOURT, A. J. Aspectos clínico-epidemiológicos de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em bovinos e eqüinos em Espírito Santo do Pinhal - SP. 1998. 120f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

BITTENCOURT, A. J.; MOYA BORJA, G. E. Flutuação sazonal de *Stomoxys calcitrans* em bovinos e eqüinos no Município de Espírito Santo do Pinhal. *Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida*, v.22, p.101-106, 2000, Suplemento.

BITTENCOURT, A. J.; MOYA BORJA, G. E. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Muscidae): preferência por locais do corpo de bovinos para alimentação. *Revista Brasileira de Zoociências*, v.4, n. 1, p. 75-83, 2002.

BRITO, L. G. Flutuação sazonal de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1981) (Díptera: Cuterebridae) através de peles de bovinos recém abatidos no matadouro do município de Piraí-RJ e infestação artificial do berne em suínos e eqüinos. 2000. 77f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

BRUCE, W. N.; DECKER, G. C. The relationship of stable fly abundance to milk production in dairy cattle. *Journal of Economic Entomology*, v. 51, n. 3, p. 269 - 274, 1958.

BRUNO, T. V.; GUIMARÃES, J. H.; SANTOS, A. M.; TUCCI, E. C. Moscas sinantrópicas (Diptera) e seus predadores que se criam em esterco de aves poedeiras confinadas, no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 37, n. 3, p. 577-590, 1993.

CAMPBELL, J. B.; WHITE, R. G.; WRIGHT, J. E.; CROOKSHANK, R.; CLANTON, D. C. Effects of stable flies on weight gain and feed efficiency of calves on growing or finishing rations. *Journal of Economic Entomology*, v. 70, n. 5, p. 592 – 594, 1977.

CAMPBELL, J. B.; BERRY, I. L.; BOXLER, D. J.; DAVIS, R. L.; CLANTON, D. C.; DEUTSCHER, G. H. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gain and feed efficiency of feedlot cattle. *Journal of Economic Entomology*, v. 80, n. 1, p. 117 - 119, 1987.

CARRERA, M. **Insetos de interesse Médico Veterinário**. Curitiba: Editora da UFPR, 1991, 228p.

CHASE, A. R.; OSBORNE, L. S.; FERGUSON, V. M. Seletive isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Florida Entomologist*, v. 62, n. 2, p. 285-292, 1986.

CHRISTMAS, P. E. Laboratory rearing of the biting fly *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), p. 446-49, 1970. Disponível em:

[http://www.ento.org.nz/nzentomologist/free\\_issues/volume%204-4-45-49.pdf](http://www.ento.org.nz/nzentomologist/free_issues/volume%204-4-45-49.pdf). Acesso em: 13 mar. 2005.

CILEK, J. E. Attraction of colored plasticized corrugated boards to adult stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Florida Entomologist*, v. 86, n. 4, p. 420-423, 2003.

COOK, D. F.; DADOUR, I. R.; KEALS, N. J. Stable fly, house fly (Diptera: Muscidae), and other nuisance fly development in poultry litter associated with horticultural crop production, *Journal of Economic Entomology*, v. 92, n. 6, p. 1352-1357, 1999.

DAVIDSON, E. W.; SWEENEY, A. W. Microbial control of vectors: A decade of progress. *Journal of Medical Entomology*, v.20, n.3, p.235-247, 1983.

DOTY, A. E. Convenient method of rearing the stable fly. *Journal of Economic Entomology*, v. 30, p. 367 - 369, 1937.

DOUGHERTY, C. T.; KNAPP, F. W.; BURRUS, P. B.; WILLIS, D. C.; BURG, J. G.; CORNELIUS, P. L.; BRADLEY, N. W. Stable flies (*S. calcitrans* L.) and the behavior of grazing beef cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 35, n. 3, p. 215 - 233, 1993.

FOIL, L. D.; HOGSETTE, J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique et technique*, v. 13, n. 4, p. 1125 – 1158, 1994.

FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W. V.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Crysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, n. 1, p. 155 - 156, 1983.

FURMAN, D.P.; CATTS, E.P. *Manual of Medical entomology*. 4a ed, Cambridge: University Press, 1982, 207p.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*. v. 21, n. 125, p. 8 – 10, 2002.

GUIMARÃES, J. H. Moscas – Biologia, ecologia e controle. *Agroquímica Ciba-Geigy*, n. 21, p. 20-26, 1983.

GUIMARÃES, J. H. Mosca dos estábulos - Uma importante praga do gado. *Agroquímica Ciba - Geigy*, n. 23, p. 10 - 14, 1984.

HALL, R.A.; PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultura and medical importance. *Parasitology*, v. 84, p. 205-240, 1982.

HANSENS, E. J. The stable fly and its infects on seashore recreational areas in New Jersey. *Journal of Economic Entomology*, v. 44, n. 4, p. 482-487, 1951.

HERD, R. P.; STRONG, L.; WARDHAUGH, K. H. Research recommendations. *Veterinary Parasitology*, v. 48, p. 337-340, 1993.

HERRERO, M. V.; MONTES, L.; SANABRIA, C.; SÁNCHEZ, A.; HERNÁNDEZ, R. Estudio inicial sobre la mosca de los establos *Stomoxys calcitrans* (Díptera: Muscidae), em la region del pacífico sur de Costa Rica. *Ciências Veterinárias*, v.XI, n. 2 e 3, p. 11-14, 1989.

JONES, C. M. Stable Flies. In: SMITH, C. N. **Insect Colonization and Mass Production**. New York: Academic Press, 1966, p. 145 - 152.

KAAYA, G. P. *Glossina morsitans morsitans*: Mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. *Acta Tropica*, v. 46, p. 107-114, 1989.

KAAYA, G. P.; MUNYINNYI, D. M. Biocontrol Ppotential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse Flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 66, p. 237-241, 1995.

KAAYA, G. P.; OKECH, M. A. Microorganisms associated with tsetse in nature: preliminary results on isolation, identification and pathogenicity. *Insect Science Application*, v. 11, n. 3, p. 443-448, 1990a.

KAAYA, G. P.; OKECH, M. A. Horizontal transmission of micotic infection in adult Tsetse, *Glossina morsitans morsitans*. *Entomophoga*, v. 35, n. 4, p. 589-600, 1990b.

KILLOUGH, R. A.; MCKINSTRY, D. M. Matting and ovoposition studies of the stable fly. *Journal of Economic Entomology*, v. 58, n. 3, 489 – 491, 1965.

KING, W. V.; LENERT, L. G. Outbreaks of *Stomoxys calcitrans* L. (“dog flies”) along Florida’s northwest coast. *Florida Entomologist*, v. XIX, n. 3, p. 33 – 39, 1936.

LARA, F. M.; MARCHIORI, D. L.; BUSOLI, A. C. Atratividade de cores a *Musca domestica* L. e *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae), à pleno sol e a sombra. *Científica*. v. 3, n. 1, p. 73 –80, 1975.

LAZARUS, W. F.; RUTZ, D. A.; MILLER, R. W.; BROWN, D. A. Costs of existing and recommended manure management practices for house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) control on dairy farms. *Journal of Economic Entomology*, v. 82, n. 4, p. 1145-1151, 1989.

LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TAROCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 3, p. 332-336, 2005.

LEE, R. M. K. W.; DAVIES, D. M. Feeding in the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) I. Destination of blood, sucrose solution and water in the alimentary canal, the effects of age on feeding and blood digestion. *Journal of Medicine Entomology*, v. 15, n. 5-6, 541-554, 1979.

LEGNER, E.F.; OLTON, G. S. The biological method and integrated control of house and stable flies in California. *California Agriculture*. v. 22, p. 1-4, 1968.

LOHMEYER, K. H.; MILLER, J. A. Pathogenicity of three formulations of enthomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Biological and Microbiol Control*.v. 99, n. 6, p. 1943-1947, 2006.

- LYSYK, T. J. Relationships between temperature and life-history parameters of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*. v. 35, n. 2, p. 107-119, 1998.
- MACEDO, D. M. Desenvolvimento pós-embriônico de *Musca domestica* (Díptera: Muscidae) e *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) criadas em fezes de bovinos tratados com diferentes avermectinas. 2001. 97f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.
- MADEIRA, N.G. Persistence of conidia of *Entomophthora muscae* in relation to age, temperature, and humidity. *BioControl*. v. 43, p. 87-95, 1998.
- MANIANIA, N. K; ODULAJA, A. Effect of species, age, and Sex of tsetse on response to infection by *Metarhizium anisopliae*. *BioControl*, v.43, p.311-323, 1998.
- MCCOY, C. W.; TIGANO-MILANI, M. S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 27, p. 87 – 93, 1992.
- MELLO, R. P. Estudo de alguns aspectos do desenvolvimento biológico e do comportamento, em laboratório, de *Stomoxys calcitrans*, (Linnaeus, 1758) (Díptera: Muscidae). 1989. 141f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1989.
- MELLO, R. P.; GARCIA, M. L. M. Comportamento reprodutivo de fêmeas de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Díptera: Muscidae) criadas isoladamente em laboratório. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 83, n. 3, p. 385-390, 1988.
- MEOLA, R. W.; HARRIS, R. L.; MEOLA, S. M.; OEHLER, D. D. Dietary-induced secretion of pheromone and development of sexual behavior in the stable fly. *Environmental Entomology*, v. 6, n. 6, p. 895-897, 1977.
- MIHOK, S.; CLAUSEN, P. H. Feeding habits of *Stomoxys* spp. stable flies in a Kenyan forest. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 10, p. 392-394, 1996.
- MORAES, A. P. R.; BADINI, P. V.; SOUZA, M. M. S.; BITTENCOURT, A. J. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 13, n. 4, p. 143-149, 2004.
- MORAES, J. L. C. Toxicidade comparativa de alguns inseticidas organofosforados e piretróides sobre larvas e adultos de *Stomoxys calcitrans* Linnaeus, 1758. 1990. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1990.
- MOYA-BORJA, G. E. O berne: biologia, comportamento e controle. *Agroquímica Ciba Geygi*, v. 17, p. 19-26, 1982.
- MOYA-BORJA, G. E. Erradicação ou manejo integrado das mífases neotropicais das Américas? *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 23, n. 32, p. 131-138, 2003.

NEVES, D. P.; FARIA, A. C. Profundidade de empupação de *Stomoxys calcitrans* (Díptera, Muscidae) e presença de microhimenópteros parasitóides nas pupas. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 48, n. 4, p. 911-913, 1988.

NEWSTEAD, R. (1906) The bionomics and life cycle of the stable fly *Stomoxys calcitrans*. *Journal of Economic Biology*, v. 1, p. 157 –166, 1906 apud MACEDO, D. M. Desenvolvimento pós-embriônico de *Musca domestica* (Díptera: Muscidae) e *Stomoxys calcitrans* (Díptera: Muscidae) criadas em fezes de bovinos tratados com diferentes avermectinas. 2001, 97f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

PARR, H. C. M. Studies on *Stomoxys calcitrans* (L.) in Uganda, East Africa. II. Notes on life – history and behaviour. *Bulletin De La Societe Entomologique D’Egite*, v. 53, n. 2, p. 437 – 443, 1962.

PELAGATTI, O.; FRATE, G. D.; PICCO, A.; CARETTA G. Fungi associated with insects found in various Italian environments: further observations. *Redia*, v. LXXVI, n. 1, p. 169-178, 1993.

PHILPOOT, M.; EZEH, A. O. The experimental transmission by *Musca* and *Stomoxys* species of *D. congolensis* infection between cattle. *British Veterinary Journal*, v. 134, n. 6, p. 515 – 520, 1978.

PUTMANN, R. J. Carrion and Dung. The decomposition of Animal Wastes. *Studies in Biology*, v. 156, p. 59, 1983.

RASMUSSEN, R. L.; CAMPBELL, J. B. Bibliograph of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.). *Web. Agric. Exp. Stn. Rep.* v. 8, p. 47, 1979 apud MELLO, R. P. Estudo de alguns aspectos do desenvolvimento biológico e do comportamento, em laboratório, de *Stomoxys calcitrans*, (Linnaeus, 1758) (Díptera: Muscidae). 1989. 141f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1989.

RICHARDSON, H. H. An efficient medium for rearing house flies throughout the year. *Science*, v. 76, p. 350-351, 1932.

RIVALIER, E.; SEYDEL, S. Nouveau procédé de culture sur lames gélosées appliqué a létude microspique des champignons deteignes. *Annals of Parasitology*, v. 10, p. 444-452, 1932 apud SENNA-NUNES, M. S. Isolamento, identificação e avaliação da patogenicidade *in vitro* de fungos em *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Díptera: Muscidae), capturadas em dois criadouros no município de Seropédica. 2000. 79f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

RIZZO, D. C. Age of three dipteran hosts as a factor governing the pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.30, p.127-130, 1977.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2ª ed, Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265 p.

SARQUIS, M.I.M.; OLIVEIRA, P.C. Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal Basic Microbiology*, v.36, n.1, p.51-58, 1996.

SENNA-NUNES, M. S. Isolamento, identificação e avaliação da patogenicidade *in vitro* de fungos em *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Díptera: Muscidae), capturadas em dois criadouros no município de Seropédica. 2000. 79f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

SENNA-NUNES, M. S. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophylum* em larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Parasitologia Latinoamericana*, v. 57, p. 134 – 140, 2002.

SKOVGARD, H.; STEENBERG, T. Activity of pupal parasitoids of the stable fly *Stomoxys calcitrans* and prevalence of entomopathogenic fungi in the stable fly and house fly *Musca domestica* in Dinmark. *BioControl*, v. 47, N. 1, p. 45 – 60, 2002.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos.** 7ª. Ed. México: Nova Editorial Interamericana, 1987. 823p.

ST. LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Prepenetration events during infection of cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 58, p. 168 – 179, 1991.

STEENBERG, T.; VAGN-JANSEN, K. M.; JESPERSEN, J. B. Flies on pastured cattle – Microbiol control of flies on pastured cattle. Disponível em: <http://www.dpil.dk/pdf.annrep/2000/ar00c7.pdf#search='Metarhizium%20Haematobia%20irritans'> Acesso em: 28 jul. 2005.

STEINHAUS, E.A. **Insect Microbiology.** New York: Comstock Publishing Company, 1946, 763 p.

STEINKRAUS, D. C.; GEDEN, C. J.; RUTZ, D. A.; KRAMER, J. P. First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales - Maniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, v.27, N. 3, p.309-312, 1990.

STEINKRAUS, D.C.; KRAMER, J. P. Susceptibility of sixteen species of Diptera to the fungal pathogen *Entomophthora muscae* (Zygomycetes: Entomophthoraceae). *Mycopathologia*. v. 100, n. 55 – 63, 1987.

STORK, M. G. The epidemiological and economic importance of fly infestation of meat and milk producing animals in Europe. *The Veterinary Record*, v. 105, p. 341 - 343, 1979.

SUTHERLAND, B. Nutritional values of different blood diets expressed as reproductive potentials in adult *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 45, n. 3, p. 209-212, 1978.

SWEETMAN, H.L. **The Biological Control of Insects.** Ithaca, New York: Comstock Publishing Company, Inc., 1936, 461 p.



TARRY, D. W.; CARROLL, P. J. Summer mastitis: transmission by blood feeding flies. *The Veterinary Record*, v. 10, p.304, 1988.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. N.; JENNINGS, F. N. **Parasitologia Veterinária**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 273p.

WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae), *Biological Control*. v. 5 p. 405-411, 1995.

WHITE, S. D.; BOURDEAU, P. Hypersensibilités aux piqûres de diptères chez les carnivores. *Le point veterinaire*, v. 27, n. 169, p. 203-206, 1995.